

中国科技核心期刊

动物学类核心期刊



CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

动物学研究

ZOOLOGICAL RESEARCH

第34卷 第2期 Vol.34 No.2

2013年4月

AMHD 灵长类动物与人类疾病模型专刊





中国科学院昆明动物研究所 中国动物学会 主办

科学出版社 出版

动物学研究（DONGWUXUE YANJIU）

第 34 卷第 2 期　　　2013 年 4 月

灵长类动物与人类疾病模型专刊目次

本期 Guest Editor: 徐林，郑永唐

封面设计：吴丽彬

《灵长类动物与人类疾病模型专刊》导读

灵长类动物是人类的近亲，利用其创建人类疾病模型，比其它模式动物能更好地模拟人类疾病进程和病理机制，已成为研究人类疾病的最佳模式动物。同时，灵长类动物在转化医学中具有不可替代的作用。作为第 3 辑《灵长类动物与人类疾病模型专刊》，我们特别组织了平顶猴、猕猴、食蟹猴和树鼩等作为研究对象的稿件 17 篇。其中综述 4 篇，研究论文、报告和简报等 13 篇，尽可能地展现相关研究领域进展，以期推动该学科领域的持续发展，继续彰显本刊特色。

国内外近年来树鼩研究进展如何？树鼩基础生物学及动物模型方面取得了哪些成绩？该领域目前存在的困难和问题、未来的研究方向是什么？中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室徐林等几位专家联名撰写的"树鼩实验动物和人类疾病的树鼩模型研究概述"较精辟地回答了这些问题。

明确树鼩的分类地位是创建利用树鼩作为实验动物的重要基础。在现有研究中，大部分核 DNA 序列研究，包括近期树鼩全基因组序列分析，都支持树鼩是灵长动物的近亲，然而绝大部分基于线粒体 DNA 的研究却显示树鼩与啮齿动物的亲缘关系更为接近。许凌等介绍了近年来关于树鼩分类地位探讨的分子证据，并综合现有不同研究的结果，认为树鼩作为灵长类的近亲这一结论应该成为共识。

为了获取适用于衡量树鼩野生群体遗传多样性及追踪其近交家系的基因标记，刘小红等开发了树鼩基因组 DNA 的 12 个微卫星标记。通过对来自于我国昆明郊区的 117 个野生树鼩个体的分析显示，这些位点表现高度杂合性，能够满足个体鉴定及近交家系分析的需求。树鼩基础生理数据对于动物模型创建尤为重要。王静等报道了驯养树鼩的基础生理指标，积累了第一手资料。

链脲佐菌素(STZ)对哺乳动物的胰岛 ß 细胞有特异毒性，被广泛用于诱导 1 型和 2 型糖尿病。吴晓云等研究表明，多次小剂量 STZ 注射可诱导树鼩出现类似 2 型糖尿病症状和糖尿病肾脏损伤。综合考虑 STZ 注射次数、成模率以及成模稳定性，两次注射 80 mg/kg 剂量的 STZ 较适合用于创建树鼩 2 型糖尿病模型。

创建合适的 HIV 感染/艾滋病非人灵长类动物模型是目前国际研究的热点和难点。平顶猴是目前唯一可以被 HIV-1 感染的旧大陆猴，在艾滋病模型研究中具有许多优势。雷爱华等全面综述了 SIV、HIV、SHIV 和 HSIV 通过静脉和黏膜途径感染平顶猴的特征，病毒在平顶猴细胞中复制的分子机制，以及建立平顶猴 AIDS 模型的限制因素和前景。庞伟等报道了北平顶猴血液学和血液生化指标参考值，为平顶猴动物模型创建提供了重要的基础生物学数据。

非人灵长类社会制度多样性的研究对解析人类社会经济地位形成的生物学基础及相关疾病治疗具有指导意义。秦冬冬等用放射免疫分析法检测了雌性猕猴毛发皮质醇含量，发现在专制猴群中，毛样皮质醇水平与社会等级无显著相关，而在缺少严格等级制的群中，毛样皮质醇水平与社会等级呈显著负相关，从属个体的毛样皮质醇水平显著高于优势个体。他们据此认为社会等级的严格程度是影响猕猴胁迫生理的因素。

何谓比较系统生物学？赵玉琪等介绍了其概念，将其定义为"比较处于不同状态下的或不同物种的生物学系统，以获得对于生命形式在交互和多样性水平所存在的特征性复杂度的完整理解"，讨论了 RNA-seq 和 ChIP-seq 技术在人类及动物模型比较系统生物学中的应用及其在未来研究中的前景。

[signature] 主编，[signature] 执行副主编

2013 年 3 月

动物模型与人类疾病机理重点实验室成功破译树鼩基因组

由中科院昆明动物所动物模型与人类疾病机理重点实验室、深圳华大基因研究院等单位合作完成的破译树鼩基因组研究工作于 2013 年 2 月在《自然·通讯》（*Nature Communications*）杂志上在线发表。研究人员通过完成高质量的树鼩（*Tupaia belangeri chinensis*）全基因组测序及比较基因组分析，阐明了其系统分类地位和相关生物学特征的遗传基础，尤其是树鼩用于若干重要疾病如 HBV、HCV 感染以及抑郁症模型创建的遗传学基础。该研究将能推动树鼩应用于生物医药的系统研究。

树鼩是一种分布于南亚、东南亚及我国西南地区的小型哺乳类动物。由于其个体较小，繁殖周期较短，养殖成本低以及与灵长类动物近的亲缘关系，一直被提议作为新型实验动物用于生物医学研究。然而，关于树鼩的分类地位尚存争议。大部分基于核 DNA 序列的研究支持树鼩是灵长动物的近缘旁系群，而绝大部分基于线粒体 DNA 序列的研究却显示树鼩与兔形目动物的亲缘关系更为密切。

研究人员利用二代测序技术完成了一只来自云南的树鼩的全基因组测序，总覆盖度高达 79X。之后与多个物种基因组进行了比较分析，从全基因组基因序列比较角度重构了树鼩与其他物种的系统发育关系，证实了树鼩与灵长类亲缘关系最为接近。这一研究结果从基因组水平上解决了树鼩分类学方面的争论，为其在很多方面代替非人灵长类动物作为实验动物模型提供了重要依据。经过进一步分析树鼩与灵长类之间的遗传学关系，研究人员共鉴定出 28 个树鼩与灵长类共有的功能性基因。之前的研究认为这些基因属灵长类所特有。

通过对树鼩基因家族的系统分析，发现树鼩基因组中很多基因家族发生了扩张，例如免疫球蛋白 λ 轻链（IGLV）基因家族等。IGLV 基因家族的扩张，将会阻止并消除病原菌。此外，树鼩基因组中出现了一些假基因和基因丢失现象，比如前列腺特异性转谷氨酰酶 4 基因（TGM4）参与调节精液凝结的形成和溶解，在精子竞争中发挥作用，其丢失可能与树鼩的求偶体系吻合。研究人员还发现有一些重要功能基因出现了提前终止或者移码突变。这些现象较好地解释了某些树鼩的特定生物学特性。

树鼩具有很高的脑体质量比，并且其脑部结构发育和灵长类十分相似，常被用于抑郁症的研究。在本研究中，研究人员在树鼩基因组中共鉴定出 23 个已知的神经递质转运蛋白。有研究表明，某些神经递质转运蛋白是抗抑郁药物的重要靶点，可以通过抑制其活性实现对抑郁病患者的治疗。树鼩基因组中发现的这种完整而保守的神经递质转运蛋白为树鼩作为社会竞争失败导致的抑郁症模型研究，以及抗抑郁药物研制提供了重要依据。

与灵长类相似，树鼩具有发育良好的视觉系统、色彩分辨能力和眼睛构造。目前被用于近视模型创制。研究人员通过对树鼩视觉相关基因进行了全面分析，解析了其遗传学基础。研究表明，相比于人类，树鼩基因组中包含绝大多数与人类同源的视觉相关基因，但缺少了两种中波长视蛋白基因。中波长视蛋白是视锥细胞的绿光感受器，在较高级的灵长动物中与短波长视蛋白、长波长视蛋白共同形成三元色色彩分辨能力，树鼩的这一基因缺失说明其与低等灵长类一样，是二元色视觉动物。另外，与夜间视觉相关的视紫红质基因发生了快速进化，这与树鼩昼行性特征相一致。

（下转第 102 页）

动 物 学 研 究 2013，Apr. 34(2): 59−69 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2013.02059

实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述

徐 林[1,2,4]，张 云[1]，梁 斌[1]，吕龙宝[2,3,4]，陈策实[1]，陈勇彬[1]，周巨民[1]，姚永刚[1,2,4,*]

1. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室， 云南 昆明 650223；
2. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院灵长类研究中心, 云南 昆明 650223；
3. 中国科学院昆明动物研究所 实验动物中心, 云南 昆明 650223；
4. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院树鼩繁殖基地, 云南 昆明 650223

摘要：动物模型在生物医学领域（如回答人体各种重大生物学问题、解析人类疾病机理和新药研发等方面）已经做出了不可替代的巨大贡献。转化医学存在的问题使得树鼩 (*Tupaia belangeri chinensis*) 实验动物重新得到重视；人类疾病的树鼩模型也再次受到越来越多的关注。该文综述了国内外特别是近年来我国树鼩研究进展，包括树鼩基础生物学及动物模型方面取得的成绩，并分析了该领域目前存在的困难和问题，探讨了未来的一些研究方向。

关键词：树鼩；实验动物；基础生物学；人类疾病动物模型
中图分类号：Q4; Q95-331 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2013)02-0059-11

Tree shrews under the spot light: emerging model of human diseases

Lin XU[1,2,4], Yun ZHANG[1], Bin LIANG[1], Long-Bao LÜ[2,3], Ce-Shi CHEN[1], Yong-Bin CHEN[1], Ju-Min ZHOU[1], Yong-Gang YAO[1,2,4,*]

1. *Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Kunming* 650223, *China*;
2. *Kunming Primate Research Center, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China*;
3. *Experimental Animal Core Facility & Kunming Primate Research Center, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China*；
4. *Tree Shrew Inbreeding Center, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223*, China*

Abstract: Animal models are indispensible in biomedical research and have made tremendous contributions to answer fundamental questions on human biology, disease mechanisms, and to the development of new drugs and diagnostic tools. Due to the limitations of rodent models in translational medicine, tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*), the closest relative of primates, have attracted increasing attention in modeling human diseases and therapeutic responses. Here we discuss the recent progress in tree shrew biology and the development of tree shrews as human disease models including infectious diseases, metabolic diseases, neurological and psychiatric diseases, and cancers. Meanwhile, the current problems and future perspectives of the tree shrew model are explored.

Keywords: Tree shrew; Experimental animals; Fundamental biology; Animal models of human diseases

1 前 言

1.1 动物模型和模式动物的概念

人体是一个极其复杂的系统。科学家利用简单的原生动物到复杂的非人灵长类动物，为解析人体各种复杂的生物学问题和疾病机理进行了长期不懈的努力。动物模型的概念即为利用动物创建模型去模拟人体各种复杂的生物学问题以及疾病特征和过程，进而研究其基本规律和分子细胞机理。在动物模型的概念基础上，逐渐形成了模式动物的概念。为了使动物模型实验具有重复性、稳定性、可比性，以及符合动物伦理等要求，建立遗传背景清楚、稳定，饲养繁殖环境条件符合法规的动物品系就成为必要条件，这就是模式动物的概念。利用模式动物创建的动物模型，能更好地研究人体各种复杂的生物学问题、疾病机理及治疗手段 (Xu，2011)。

收稿日期：2012-12-15；接受日期：2012-12-30
基金项目：中国科学院基础前沿研究专项项目(KSCX2-EW-J-23)；863 课题(2012AA021801)；中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-R-11，KSCX2-EW-R-12)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: yaoyg@mail.kiz.ac.cn

1.2 动物模型的重要性

尽管早期没有成熟的模式动物，纵观 100 多年的诺贝尔生理学或医学奖，仍可清晰地看到动物模型在生物医学领域中的重要地位。1901—2012 年，共有 201 位科学家获得诺贝尔生理学或医学奖(http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/index.html)，其中 166 位的科研成果来自于动物模型实验，占诺贝尔生理学或医学奖的 83%。特别是在过去的 40 年间 (1973—2012 年)，94 位获得诺贝尔生理学或医学奖的科学家中，仅 Barbara McClintock 博士因植物遗传学(转座子理论)获奖(1983 年)，其他 93 位 (99%)科学家的获奖均得益于动物模型实验。这些重大生物医学成果涉及的动物种类包括原生动物、线虫、软体动物、甲壳动物、果蝇、鱼类、鸟类、两栖类、爬行类、啮齿类 (大、小鼠)、兔、猪、牛、羊、马、以及非人灵长类等(图 1)。许多诺贝尔生理学或医学奖获得者使用多种动物，因为每种动物具有各自的优缺点，对解决特定问题具有特殊的优势。由于伦理及其他问题，如可控性和方便操作等，许多基于人类疾病机理解析和药物研发的实验只能依赖于动物模型的建立和研究 (Xu，2011)。

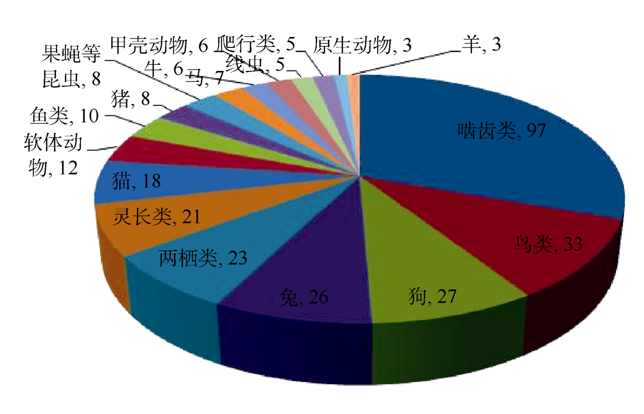


图 1 使用不同种类动物的诺贝尔生理学和医学奖获奖人数
Figure 1 Number of Noble laureates and animal models used

1.3 动物模型的最佳策略

随着基因组学、表观基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学等研究的迅猛发展，各种动物在生物医学研究领域中的地位正经历着剧变，研究者已经逐渐清楚认识利用不同动物模型回答人体各种重大生物问题和疾病机理的优缺点。总的来说，低等动物的优点是实验周期短、成本低及基因操作方便等；缺点是与人类的差异性较大。相反，高等动物如非人灵长类与人类的差异性小，研究结果很容易直接转化为临床应用；缺点是实验周期长，成本高且基因操作困难等。

任何一种有机体即使是简单的原生动物也是一个极其复杂的生命系统，而人类的生命系统尤其是大脑已经演化成自然界最复杂的系统。然而，生命现象在分子细胞层次上却仍然遵循着相似或相同的最基本规律。因此，如果想回答人体各种重大的生物学问题和疾病的分子细胞机理，使用低等动物显然具有独特优势；相反，如果想回答各种分子细胞机理是否在整体水平上表现类似于人类的生物学问题以及疾病特征和过程，则必须依赖高等动物。

值得特别关注的是，其他动物（如广泛使用的啮齿类）在分子细胞层次上能提供极大帮助，但研究人类特有的疾病以及智力和创造力，则使用非人灵长类动物在整体水平上具有不可替代的优势。因而，理解人体各种重大生物问题和疾病机理的最佳策略有两个选择：1)低等动物的分子细胞机理研究和高等非人灵长类动物的整体系统水平研究相结合；2)寻找新型动物模型，兼顾成本低、试验周期短、分子和细胞操作方便并与人类进化地位接近等各种生物学特性。前者已被许多诺贝尔生理学或医学奖获得者采用，而后者正在被科学家和生物医药领域采用，如树鼩(*Tupaia belangeri chinensis*)即为后者最典型的动物。

树鼩被认为是灵长类最亲密的近亲，已有证据表明树鼩非常适合用于研究人体的近视、心理应激和肝炎等问题(Cao et al，2003；Wang et al，2012)。作为实验动物，树鼩在生命医学领域已被使用 30 多年。本文重点归纳了国内外，特别是近年来我国在树鼩基础生物学及疾病动物模型研制方面取得的进展，分析和讨论了该领域存在的困难和未来的研究方向。

2 树鼩基础生物学

2.1 树鼩简介

树鼩属攀鼩目(Scandentia)树鼩科(Tupaiidae)。我国现生树鼩被认为有 1 属 1 种 6 个亚种，即中缅树鼩 (*Tupaia belangeri*) 1 个种，6 个亚种 (Peng et al，1991；Wang，1987)。云南是野生树鼩分布的主要区域之一，拥有 3 个亚种 (Wang，1987)。树鼩体型小，与大鼠类似，在人工繁殖条件下无明显繁殖季节，孕期短，生殖与发育周期短，出生后 4～6

个月就达到成年期，每胎 2～6 只。

中国科学院昆明动物研究所是国内最早开展树鼩研究的单位，早在 1991 年就出版了国内第一本也是目前仅有的一本《树鼩生物学》。专著系统总结了树鼩生物学特性，包括树鼩分类与生态学、饲养与繁殖、寄生虫学与病理学、解剖学、神经生物学、遗传学、生物化学和免疫学等 (Peng et al，1991)。该专著出版后，陆续也有学者发表了一些树鼩生物学基础数据，如近期 Ma et al (2011)研究比较了野生和人工繁育树鼩的部分生理指标，发现在两组动物中肌酸激酶、肌钙蛋白 I、总胆汁酸、果糖胺及低密度脂蛋白胆固醇等生理生化指标在性别间无显著差异，而在野生和人工繁育个体中存在差异，且野生个体间差异较大。Wang et al (2013)研究了树鼩体重、体温、进食量、尿量，以及血液中各种激素含量。Wu et al (2013)研究了 992 只树鼩体重、空腹血糖、性别和年龄之间的关系，发现其空腹血糖随体重增加而上升，且该相关性仅见于雄性个体。雌性树鼩的体重、空腹血糖、腰围随年龄而增加。树鼩体重、空腹血糖、性别和年龄之间的关系与其他非人灵长类和人类非常相似。这些基础数据的获得，进一步丰富了我们对于树鼩的认识。

最近，昆明动物研究所组织了中缅树鼩全基因组测定和解析工作，得到了高覆盖度(79X)的基因组序列。通过基因组分析，发现树鼩在神经及免疫系统等方面与人类具有较为高度的同源性，在很多方面具有可用来替代猕猴等大型灵长类实验动物的遗传基础，可能还适合于更多的免疫学、神经生物学及代谢等生物学问题和疾病机理研究(Fan et al，2012)。同时，比较基因组分析发现，树鼩药物代谢酶与人体接近，而猕猴则缺失一大家族的药物代谢酶。Li RX et al (2012) 的研究表明，树鼩的肝脏和肌肉组织蛋白组表达谱较啮齿类动物大鼠和小鼠更接近于人类。这些树鼩资源优势和研究积累，为进一步发掘树鼩资源，建立树鼩实验动物品系和模型奠定了极好的基础。

2.2　树鼩是灵长类近亲

长期以来，树鼩与灵长类的亲缘关系一直存在争论。尽管目前树鼩的具体系统发育分类地位仍有争议，但多数研究显示其与灵长类具有最接近的亲缘关系(Xu et al，2013)。基于不同类型的遗传学数据，得到的树鼩与灵长类关系也不尽相同 (Xu et al，2013)。Adkins & Honeycutt (1991)通过线粒体细胞色素氧化酶 II (COX II)将树鼩与其他 7 个哺乳动物线粒体 COX II 序列进行系统发育划分，证实树鼩是与灵长目动物最近缘的动物。Xu et al (2012)及 Schmitz et al (2000)在构建线粒体 12 个蛋白编码基因的系统发育树时，发现树鼩与兔形目动物之间的关系更加密切，而皮翼目动物和灵长类动物组成姐妹群。在利用多个核基因序列构树时依然出现了这样不一致的结果 (Xu et al，2013)。Janečka et al (2007) 根据 21 个灵长总目动物的基因组中罕见的外显子插入缺失和长度约为 14 kb 的 19 个核基因拼接片段构建的系统树显示树鼩与灵长类的亲缘关系更近。Lindblad-Toh et al (2011)利用美国 Broad 研究所公布的 2X 的树鼩基因组数据重构 29 个哺乳动物的系统发育关系，树鼩是其中最接近灵长类的动物。然而 Hallström & Janke (2010)利用 3000 基因重构系统发育树却显示树鼩与啮齿总目的亲缘关系更近。基于染色体图染数据分析的结果显示树鼩目与皮翼目形成姐妹群 (Nie et al，2008)。昆明动物所近期基于高质量的中缅树鼩的全基因组中 2 117 个单拷贝基因重构了树鼩与 14 个哺乳类动物(其中包括 6 个灵长类物种)的系统发育关系，显示树鼩与灵长类的亲缘关系更近，解决了长久以来关于树鼩进化地位的争议。在将树鼩和啮齿类的蛋白质序列与人的同源基因进行一对一比较时，发现人与树鼩之间较人与啮齿类之间拥有更高的蛋白质相似度，进一步说明树鼩与灵长类亲缘关系更近。同时发现树鼩与灵长类在一些重要的神经系统和免疫系统信号通路中拥有高度的同源性 (Fan et al，2012)。

2.3　树鼩实验动物化和品系的创制

由于受到资源的限制，国际上饲养、繁殖树鼩的中心不多，仅有德国灵长类中心(Gottingen)、美国伯明翰阿拉巴马大学、美国圣地亚哥野生动物园、墨西哥沃尔夫繁殖中心和欧洲灵长类中心(荷兰)等，远少于灵长类饲养繁殖中心。国际大多数文献中使用的树鼩来自德国灵长类中心。国内大多数文献和国际部分文献中使用的树鼩来自中国科学院昆明动物所实验动物中心。

我国从上世纪 70—80 年代开展树鼩人工驯养繁殖及相关研究，研究力量主要集中在昆明，如中国科学院昆明动物研究所、中国医学科学院医学生物学研究所、昆明医科大学及云南省地方病防治研究所等科研院校 (Shen et al，2011)。昆明动物研究所是我国开展树鼩人工驯养繁殖最早的单位，通过

对树鼩饲养环境及设施、微生物、寄生虫和配合饲料等的不断探索改进，已形成规范的饲养管理体系，繁育技术成熟，实现了树鼩的标准化人工驯养繁育，并于2012年10月通过树鼩生产和使用许可证认证，成为全国首家获得树鼩生产许可证的单位，意味着树鼩将更容易被推广至全国乃至世界。目前昆明动物研究所稳定的树鼩饲养繁殖种群～3000头，每年为国内外几十家单位提供实验树鼩～1000头；人工饲养的封闭群树鼩已经达到子6代；“十二五”末预期繁殖饲养规模达到4000～5000头，并育成近交系第5代。昆明医科大学、广西医科大学、中国医学科学院医学生物学研究所等多家单位也开展了树鼩的驯养繁殖工作(Shen et al，2011)，并取得了不少成功经验。2010年，由昆明医学院调研和编制，云南省质量技术监督局颁布《实验树鼩云南省地方标准》——《实验树鼩(DB53/T 328.1-328.5—2010)》，形成了实验动物树鼩的云南省地方标准。

然而，目前研究中使用的树鼩大多来自野外或驯化后代，它们的年龄和遗传背景很不清楚，且个体差异较大，这使得利用树鼩进行疾病机理研究和新药创制困难重重。因此，创建遗传背景清晰、稳定的树鼩品系尤为重要。建立树鼩近交系是一项长期且艰巨的任务，目前国内外还未能培育出树鼩的近交系。昆明动物研究所目前已就这一难题组织了专门的团队进行攻关，已经建立了200多个家系的近交繁殖群体，获得了兄弟姐妹近交F2代树鼩。同时，为了更好地评估树鼩资源，我们在前期还对来自昆明郊区的树鼩群体进行了mtDNA遗传多样性评估，发现该树鼩群体具有较高的遗传多样性(Chen et al，2011)。为配合树鼩近交系建立和评估工作，我们设计了一套可用于树鼩个体识别和亲权鉴定分析的微卫星标记。采用该标记，可达到＞99.99999998%的个体区分识别能力。通过分析117只采自于云南省昆明周边的树鼩群体这套12个微卫星座位的多态性，显示了较高的期望杂合度(0.616)，进一步支持我们mtDNA分析揭示的树鼩群体高度多态性(Liu & Yao，2013)。

3 树鼩动物模型研究现状

树鼩作为灵长类动物的近亲，在生理解剖、神经发育、病毒感染特性及心理应激模式等方面与灵长类甚至人类之间存在高度的相似性。在神经系统方面，树鼩的四爪对趾使其能够单爪抓握东西，说明其神经系统发育良好；人类前额叶高度发育，树鼩与灵长类的大脑前额叶已经发育，而大、小鼠等的大脑前额叶几乎没有发育；树鼩的大脑/体重比甚至高于人类 (Peng et al，1991)。树鼩神经系统的这些发育特点，无疑为采用树鼩作为人类神经系统疾病的动物模型提供了坚实基础。同时，树鼩体表面积与人体60 kg的换算比例为5.1，大鼠为7，而小鼠则高达14 [1]，提示相对于大鼠、小鼠，树鼩可更好地应用于药物研究。另外，树鼩的许多病毒感染特性与人类相似，报道显示树鼩能感染人类甲肝、乙肝、丙肝、轮状、疱疹、腺、棒状及副粘等病毒(Han et al, 2011；Li et al，2011；Peng et al，1991；Wang et al, 2011)。

3.1 感染性疾病树鼩模型

3.1.1 病毒性肝炎模型

除人类之外，目前能自然感染人乙型、丙型肝炎病毒的只有黑猩猩。但是因其资源匮乏、再加上经济和道德伦理上的问题阻碍了黑猩猩模型的发展。将肝炎病毒基因导入小鼠内的转基因模型不能模拟病毒感染的过程。而人肝细胞嵌合小鼠(human hepatocyte chimeric mice)虽经证实能感染人乙型、丙型肝炎病毒，但无法用于研究肝炎病毒感染的炎症和免疫反应以及感染后期症状(如肝炎病毒感染引起的肝癌)(Chayama et al，2011)。

甲型肝炎(hepatitis A virus, HAV)模型 Zhan et al (1981)首次报道了利用树鼩作为动物模型，用甲肝病毒阳性病人的新鲜大便滤液感染动物，证明人的甲型肝炎病毒可以在树鼩体内繁殖，但是否引起树鼩肝病变尚无明确研究。

乙型肝炎(hepatitis B virus, HBV)模型 乙肝病毒是一种DNA病毒，属嗜肝DNA病毒科(hepadnaviridae)。Pang et al (1981)报道了“乙型肝炎病毒感染树鼩的实验研究”。随后，广西肿瘤防治研究所Su et al (1986)用分子杂交、电镜、血清免疫学和免疫组化等技术，证实树鼩能够感染人的HBV病毒。后来广西医科大学肿瘤防治研究所Yan et al (1984)用人血来源的HBV感染树鼩，确定10只动物中有7只感染。这些工作表明除人类、黑猩猩以

[1] 引自王庆国, 屈会化, 赵琰, 吴婷婷, 李翼飞, 戴进, 胡丽娜. 2012. 树鼩模型在中医药研究中的应用. 第一届灵长类动物模型学术论坛会议摘要集, 云南, 昆明：p49.

外，树鼩能感染人 HBV，且具有成本低、实验操作方便、不受动物伦理严格限制等独特优点。Walter et al (1996)通过体内外实验，进一步证实树鼩可以作为人 HBV 感染的研究模型。值得注意的是，Walter et al (1996)报道的树鼩新生期接种人 HBV，结果类似于人的急性自限性肝炎，而树鼩成年期接种则表现为一过性感染。Liang et al (2006)用幼年和围生期的树鼩感染人 HBV，揭示可以提高感染效率。

虽然国内外研究树鼩 HBV 感染已经有 20 多年，但树鼩体内感染能否长期持续仍存争议(Li et al，2011)。Yang et al (2009)用新生树鼩感染人 HBV，证实病毒能在动物体内长期存在并稳定复制。瑞士的 Walter et al (1996)报道的树鼩体外感染人 HBV 的研究，促进了HBV感染机理的研究。德国的Glebe et al (2003)发现人 HBV 的 Pre-S1 抗原在感染树鼩肝细胞中起重要作用。最近，北京生命科学研究所 Yan et al (2012)根据已经报道的 HBV 结合受体的肽段 Pre-S1 设计探针，借鉴 Walter et al (1996)报道的树鼩肝细胞体外培养方法，以树鼩原代肝细胞(primary *Tupaia* hepatocytes, PTH)为材料，找到了乙肝病毒和丁肝病毒的共用受体——钠离子−牛磺胆酸共转运多肽。这一发现将有力推动有效治疗乙肝药物的研究和解析乙肝病毒感染机理。

丙型肝炎(hepatitis C virus, HCV)模型 丙型肝炎的动物模型主要有黑猩猩、猴类、人工改造的小鼠和树鼩 (Li et al，2011)。Wang et al (1997)和 Liu et al (1998)用 HCV 阳性血清感染树鼩，结果动物出现不同程度的肝炎症状。Xie et al (1998)用 HCV 感染射线处理后的树鼩，发现辐射后的树鼩对 HCV 更易感。Amako et al (2010)进行了长达 3 年的 HCV 感染树鼩研究，进一步证实了树鼩可以作为 HCV 感染的动物模型。虽然已经证明树鼩对 HCV 易感，但目前缺乏树鼩试验动物的标准品系，对实验数据的可重复性及可信度提出了挑战，因此，大部分科学家仍然倾向于使用改造过的传统实验动物(如小鼠)。正如美国学者 Robert Lanford 所表示，“如果研发花费数百万美元的药物进入临床前的最后试验阶段，我们需要寻找一个可以重复的模型”(Dolgin，2011)。

丁型肝炎(hepatitis D virus, HDV)模型 丁肝病毒的复制必需依靠乙肝病毒的辅助，因此丁肝病毒感染模型必须以乙肝病毒感染为基础(Chen et al，2008)。Li et al (1995)建立了树鼩丁型肝炎/乙型肝炎感染模型，并证实树鼩的病理变化与黑猩猩的感染类似，提示树鼩可以建立 HDV 感染的动物模型。

就目前的研究资料看，除人和黑猩猩外，树鼩是经证实能感染人乙、丙型肝炎病毒的小型哺乳类动物，其他动物模型，如啮齿类动物和禽类动物病毒性肝炎模型的不足都可以通过树鼩模型来解决。因此，树鼩作为肝炎病毒感染的动物模型具有独特的优势和不可替代的价值。

3.1.2 耐药细菌感染和败血症模型

自抗生素发明以来，大量耐药菌株的出现使人类又面临新的挑战。感染是目前医院住院病人死亡的主要原因之一。美国败血症感染～75 万/年，死亡 22.5 万(Hotchkiss & Karl，2003)。良好的细菌感染模型能够提供有效的研究途径。目前人们主要用啮齿类动物，如大鼠、小鼠建立细菌感染的动物模型，但由于种属差异，在细菌感染发病进程、机制及药物药效学和毒理学方面与人临床存在较大差异。如人败血症是由感染引起的全身性炎症反应(Goldstein et al，2005)，而传统的败血症动物模型(如啮齿类)则表现在对内毒素反应的敏感程度和细胞因子的动态水平等方面(Dyson & Singer，2009)。Li SA et al (2012)报道了树鼩金黄色葡萄球菌皮肤烫伤感染模型和绿脓杆菌涤纶补片包埋感染模型，表明树鼩能够构建细菌感染模型和评价抗菌药物。而他们用细菌脂多糖(LPS)建立的树鼩败血症模型表明，树鼩对 LPS 的反应跟小鼠有较大差异，而与人更为接近，提示树鼩有望成为更好的败血症模型[2]。作为低等灵长类，树鼩有望替代啮齿类更好地模拟人败血症的发生和病理进程以及药物药效和毒理反应等，值得进一步深入研究。

3.2 精神和神经疾病模型

3.2.1 心理应激和抑郁症动物模型

有机体对伤害性事件的适应性反应称为应激。应激是临床医学中涉及的一个普遍生物学问题，可导致或恶化一系列人类重大疾病。研究显示，树鼩是对心理应激最敏感的动物。束缚应激导致树鼩皮质醇增高，是非人灵长类和人类的独有特点，而啮齿类动物的应激反应则为皮质酮增高(Collins et al，

[2] 引自 Li SA, Liu J, Zhang Y. 2012. Tree shrew, a potential experimental animal for sepsis model. 第一届灵长类动物模型学术论坛会议摘要集. 云南, 昆明：p30.

1984)。Fuchs et al (1990)报道社会竞争失败导致树鼩尿液的褪黑素大幅度增高，可能与海马糖皮质激素受体减少有关，导致应激反应长时间持续(Jöhren et al，1994)。慢性社会竞争失败的树鼩由于皮质醇持续增高，导致海马 CA3 区神经细胞出现萎缩现象，这与人类抑郁症患者的海马萎缩现象高度一致(Magariños et al，1996)。成年神经细胞新生是 20 世纪末最重要的神经科学进展之一，Gould et al (1997) 利用树鼩证明了心理应激能通过 NMDA 受体影响成年海马神经细胞新生。

由于心理应激是抑郁症的主要诱因之一，利用树鼩创建应激病因学的抑郁症模型就有可能模拟人类抑郁症的一些重要特征，而在其他动物 (如啮齿类)中却难以做到，因为树鼩、猴子和人类应激系统的最基本激素均为皮质醇，而啮齿类则为皮质酮。Wang et al (2012)详细分析了树鼩作为抑郁症动物模型的潜在优势，即除了脑生理结构和竞争失败后的反应与人相似外，其昼行习性可以弥补啮齿类动物夜行习性的不足。利用树鼩进行打斗，建立社会竞争失败的抑郁症模型，打斗失败树鼩表现出和人相似的抑郁症状(Wang et al，2011)。Meng et al [3] 以糖水偏爱和糖水操作式条件反射方法，建立了反应快感缺失和动机缺乏的抑郁症树鼩模型。德国 Fuchs & Flugge (2002)详细研究了打斗挫败树鼩的生理、脑功能和行为表现，证明挫败树鼩的行为和内分泌症状与抑郁症患者相似，并且可以通过药物治疗进行改善，认为树鼩是研究抑郁的适合模型(Lucassen et al，2004)。值得注意的是，应激导致的树鼩神经肽 Y 的改变与灵长类相似，与啮齿类则完全相反(Zambello et al，2010)。因此，应激病因学的抑郁症树鼩模型，可能是模拟人类抑郁症的理想模型之一，已经得到了领域同行的认可(Fuchs，2005; Vollmayr et al，2007)。

3.2.2 树鼩近视模型

目前近视研究主要是利用鸡、猴子和树鼩建立动物模型。鸡的近视模型最大问题是其亲缘关系和人相对较远，眼睛生理结构与和人有很多不同。虽然猴子与人在眼睛大小和结构上最接近，但是它们的实验成本高、周期长，而且很难区分长时间形觉剥夺(visual form deprivation)造成的实验性近视眼是干预的结果，还是由于从视网膜传递信号到巩膜引起的。树鼩实验成本低、周期短，且其眼睛发育过程与人相似。在形觉剥夺实验中能精确地控制视觉环境，得到稳定的结果。可以通过化学物质(如 β-APN 或者 DPA)诱导 (Norton，1999)，或形觉剥夺来建立树鼩近视模型(McBrien & Norton，1994; Norton，1999)。动物模型能够方便我们研究近视产生的机理、探索预防和治疗措施。McBrien et al (2012)的研究表明，短时间戴凸镜或许可以在一定程度上矫正近视。通过对转录水平和翻译水平的研究 (Frost & Norton，2012；Siegwart & Norton，2002)，可更深入地了解近视的机制。由此可见，树鼩在近视模型中占有重要地位，已成为国际公认的近视动物模型。

3.2.3 树鼩老年痴呆模型

Pawlik et al (1999)就报道了老年树鼩存在类似于人类老年痴呆症病理样的老年斑，最近 Yamashita (2012) 的报道支持了猕猴和树鼩均有这种人类老年痴呆症病理样的老年斑。另外，通过对树鼩基因组的分析，发现人类与老年痴呆症有关的基因和树鼩中的直系基因具有较高的同源度(Fan et al，2012)。显然，树鼩有可能是创建人类老年痴呆症模型的另一理想动物。

3.3 代谢性疾病模型

Schwaier (1979)报道了高胆固醇饮食可诱发树鼩生成胆结石，是胆结石研究合适、方便的模型。

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)是链球菌产生的天然化合物，对哺乳动物的胰岛 B 细胞有特异毒性，被广泛用于诱导 1 型和 2 型糖尿病。Ishiko et al (1997)和 Xian et al (2000)初步报道利用不同浓度的 STZ 可以诱导树鼩患糖尿病。人类 2 型糖尿病患者和非人灵长类 2 型糖尿病动物的胰腺具有胰岛细胞淀粉样沉积，Wagner et al (2001)证实 STZ 诱导的糖尿病食蟹猴并没有淀粉样沉积症状，但 Xian et al (2000)用 STZ 诱导的糖尿病树鼩淀粉染色呈阳性, 是否是胰岛细胞淀粉样沉积需要进一步证实。

Wu et al (2012) 开展了树鼩糖尿病的动物模型研究，多次小剂量 STZ (60～80 mg/kg) 能够导致树鼩糖尿病。注射 STZ 后，成模树鼩出现明显的多饮、多食和多尿症状；持续高血糖、尿糖；糖耐受明显受损，且出现明显糖脂代谢紊乱；肾功能显著受损；未出现糖尿病乳酸中毒和高血糖高渗等并发症。

[3] 引自孟肖路, 朱宁, 隋南, 祁可可. 2012. 新型树鼩社会挫败模型的建立. 第一届灵长类动物模型学术论坛会议摘要集, 云南，昆明： p38.

Zhang et al [4]开展了树鼩非酒精性脂肪肝模型的研究，高脂、高糖、高胆固醇食物能够诱导树鼩脂肪肝，病症与人非酒精性脂肪肝类似，具有成模率高、可模拟人疾病进程的特点，值得进一步深入研究。

Li & Zhang (1999)用树鼩开展脑缺血疾病研究，已成功建立了光诱导树鼩脑缺血模型。由于树鼩颅骨很薄，可通过光照射进行诱导，使大脑血管形成血栓，造成大脑缺血；加上其大脑发达，与灵长类接近，且经济、容易饲养，被认为是研究脑血管疾病机制的理想动物。

3.4　癌症模型

树鼩是比较理想的肿瘤模型。首先，多个报道显示树鼩自发各种肿瘤。Elliot et al (1966)报道了第一例树鼩自发乳腺癌模型，随后几种其他自发肿瘤如肝癌(Hofmann et al，1981)、淋巴瘤 (Brack，1998)和肺癌(Brack et al，1996)等也被报道。Xia et al (2012)鉴定了一例自发性乳腺肿瘤，该肿瘤与人导管乳头状瘤很接近，提示树鼩可以用于建立乳腺肿瘤模型。其次，树鼩可以诱发各种癌症。Reddy et al (1976)用黄曲霉毒素诱导树鼩肝癌获得成功。Yan et al (1996)组合乙肝病毒感染和黄曲霉毒素在 52.9%的树鼩中成功诱发肝癌，在树鼩肝癌中检测到 *p53* 抑癌基因突变(Park et al，2000)以及癌基因 *Ras* 表达上调 (Su et al，2004)。蛋白质谱分析发现了大量表达畸变的蛋白(Li et al，2008)。该团队的研究发现 Oltipraz 可以减少黄曲霉毒素诱发树鼩产生肝癌(Li et al，2000)。此外，树鼩还可以诱导肺癌和乳腺癌。Rao & Reddy (1980)报道用致癌剂 DHPN 可以诱导树鼩在 65～102 周生成肺癌。中科院昆明动物所陈策实在 2012 年云南昆明第一届灵长类动物模型学术论坛上，介绍了用致癌剂 DMBA 组合孕激素以及慢病毒导入癌基因的方法可以建立树鼩乳腺肿瘤。

因为肿瘤发生和生理生化有关，树鼩癌症模型相对小鼠模型具有诸多优势。例如小鼠诱导的乳腺癌模型一般为雌激素受体 ER 阴性，而 60%～70%的人乳腺癌患者为 ER 阳性，同时，小鼠乳腺癌和人病理组织形态差异较大。另外，小鼠的乳腺癌转移多为肺部转移，而在乳腺癌患者中肿瘤细胞常经局部淋巴管转移至淋巴结然后多发生骨、脑等部位转移，这可能是由于小鼠和人的归巢机制有较大差异。此外，已知端粒在癌症发生发展过程中扮演着很重要的角色。小鼠细胞染色体端粒较长(40～60 kb)，而人染色体端粒较短(10 kb)，因此，小鼠细胞易于永生化和转化。由于和人更加类似的进化地位，树鼩乳腺癌模型较小鼠模型在生理和病理方面更加接近人乳腺癌。

肿瘤发生发展与个体精神状态有关，不同的精神压力会调控肿瘤生长。树鼩在神经系统方面具有啮齿类无法比拟的优势，较啮齿类更适用于研究精神压力与肿瘤的关系。

此外，免疫系统在肿瘤发生中发挥着重要作用，免疫细胞一方面清除肿瘤细胞，另一方面被肿瘤细胞利用促进生长和转移。多种肿瘤，如肝癌、宫颈癌、鼻咽癌等均与病毒和细菌感染相关。而免疫系统在不同物种间的差异很大，树鼩的免疫系统与人更加接近 (Fan et al，2012)，在评价涉及免疫系统的抗肿瘤药物如单克隆抗体、疫苗和促进机体免疫力的治疗方法等研究领域更具优势。

虽然树鼩在创制癌症模型方面相对小鼠更具优势，但是目前还需要完善树鼩相关的基础研究，全面了解树鼩与人和鼠的各种组织尤其是神经和免疫系统的异同，为创建与人发病机理更加类似的树鼩癌症模型奠定基础。

4　现存问题和未来展望

迄今为止，还没有一种国际上广泛使用的动物模型由我国科学家创建。近年来，树鼩作为一种新型实验动物，正日益受到国内外的关注。中国科学院昆明动物研究所于 2012 年 12 月在昆明主办了“第一届灵长类动物模型学术论坛”研讨会，会议摘要的一半是关于树鼩研究的。用树鼩原代肝细胞找到乙肝和丁肝病毒受体的科学突破(Yan et al，2012)，也极大地激励着我们去探索树鼩模型的物种优势。

通过昆明动物所近期对树鼩全基因组、转录组(Fan et al，2012)及蛋白组(Li RX et al，2012)的解析，我们了解到树鼩与灵长类的遗传特征接近，这为我们了解树鼩生物学特性，发掘其用于疾病模型创

[4] 引自：Zhang L, Wu X, Chang Q, Li Y, Liao S, Liang B. 2012. The establishment of tree shrew model of non-alcoholic fatty liver disease. 第一届灵长类动物模型学术论坛会议摘要集. 云南，昆明: p65.

制、疾病机理解析和新药创制，以及回答一些重大科学问题提供了扎实的科学数据。现有文献报道了相当多的树鼩基础生物学数据，但是一些关键数据，如树鼩脑组织精细解剖图谱分析等依然缺乏。而且，相对于其他成熟的实验动物，现有的树鼩基础生物学数据和专有检测试剂远远不够，而传统的实验动物如小鼠则存在有大量共享的网上生物信息资源及商业化的蛋白抗体等。这种信息匮乏的情况制约着今后在分子水平上研发人类疾病的树鼩动物模型，国内外对于树鼩研究的重视程度和产出有待大幅提高(图 2)。我们需要系统地了解树鼩基因组、转录组、蛋白质组、神经系统 (脑功能)重、代谢系统和免疫系统分子基础、基因和蛋白质结构和功能信息及生物学行为等信息。

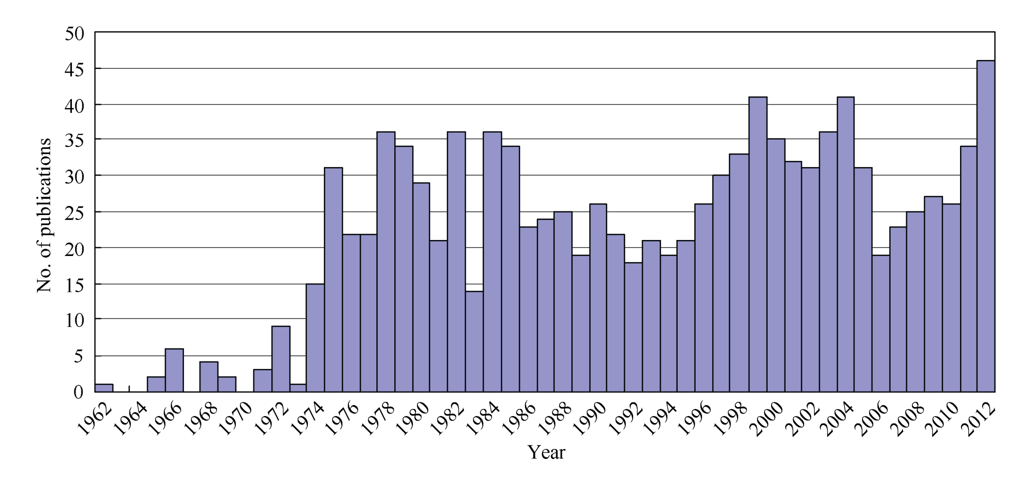


图 2 采用“tree shrews”在 PubMed 数据库中检索的文献数

Figure 2 Number of publications retrieved by key word “tree shrews” through PubMed on Nov. 25, 2012 (1112 publications)

实验动物饲养和繁殖条件的标准化、质量的标准化、以及检测方法与技术的标准化和规范化都是规模化应用实验动物进行人类疾病研究和新药研发的基本必要条件。虽然树鼩已被较多地应用于医学生物学基础研究中，也有一些积累和发现，但迄今为止，我们仍然缺乏遗传背景清晰、遗传成分稳定的种群或品系，这使得现有研究工作在深度及广度方面均存在缺陷，有待进一步提升。建立树鼩纯品系和相关封闭繁殖群，尽早完成其实验动物的模式化和标准化，并在全国乃至全世界予以推广，是目前我们迫切需要解决的一个重大问题。与此同时，需要深入阐述树鼩模型在哪些重大生物学问题和人类疾病研究中具有不可替代的优势，最终实现“中国制造”的树鼩品系和模型。这些工作的开展和最终完成，将彻底解决树鼩在疾病机理研究和新药研发中广泛应用的瓶颈。毫无疑问，这是一个需要长时间积累、延续和不断大量投入的系统工作。

致谢：非常感谢中国科学院昆明动物研究所王霜女士在文稿的整理中给予的巨大帮助！同时感谢郑永唐研究员、赖仞研究员、赵旭东研究员和张华堂研究员对本文的支持和关注。由于篇幅和写作时间的局限，我们对于树鼩研究工作的介绍不能作到面面俱到，对于文中未能引用的文献，在此向原作者致歉。

参考文献：

Adkins RM, Honeycutt RL. 1991. Molecular phylogeny of the superorder archonta. *Proc Natl Acad Sci USA,* **88**(22): 10317-10321.

Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, Kohara M. 2010. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J Virol,* **84**(1): 303-311.

Brack M. 1998. Spontaneous tumours in tree shrews (*Tupaia belangeri*): population studies. *J Comp Pathol,* **118**(4): 301-316.

Brack M, Schwartz P, Heinrichs T, Schultz M, Fuchs E. 1996. Tumors of the respiratory tract observed at the German Primate Center, 1978-1994. *J Med Primatol,* **25**(6): 424-434.

Cao J, Yang, EB, Su JJ, Li Y, Chow P. 2003. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research. *J Med Primatol,*

32(3): 123-130.

Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, Imamura M. 2011. Animal model for study of human hepatitis viruses. *J Gastroenterol Hepatol,* **26**(1): 13-18.

Chen J, Dai JJ, Sun XM. 2008. Advances in the use of tree shrews as animal models for hepatitis research. *Chn J Com Med,* **18**(2): 59-62. [陈瑾, 代解杰, 孙晓梅. 2008. 树鼩肝炎动物模型的研究进展. 中国比较医学杂志, **18**(2): 59-62.]

Chen SY, Xu L, Lü LB, Yao YG. 2011. Genetic diversity and matrilineal structure in Chinese tree shrews inhabiting Kunming, China. *Zool Res,* **32**(1): 17-23. [陈仕毅, 许凌, 吕龙宝, 姚永刚. 2011. 昆明城郊中国树鼩群体线粒体 DNA 遗传多样性. 动物学研究, **32**(1): 17-23.]

Collins PM, Tsang WN, Metzger JM. 1984. Influence of stress on adrenocortical function in the male tree shrew (*Tupaia belangeri*). *Gen Comp Endocrinol,* **55**(3): 450-457.

Dolgin E. 2011. The murine candidate. *Nature,* **474**(7350): S14-S15.

Dyson A, Singer M. 2009. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting?. *Crit Care Med,* **37**(1): S30-S37.

Elliot OS, Elliot MW, Lisco H. 1966. Breast cancer in a tree shrew (*Tupaia glis*). *Nature,* **211**(5053): 1105.

Fan Y, Huang ZY, Cao CC, Chen CS, Chen YX, Fan DD, He J, Hou HL, Hu L, Hu XT, Jiang XT, Lai R, Lang YS, Liang B, Liao SG, Mu D, Ma YY, Niu YY, Sun XQ, Xia JQ, Xiao J, Xiong ZQ, Xu L, Yang L, Zhang Y, Zhao W, Zhao XD, Zheng YT, Zhou JM, Zhu YB, Zhang GJ, Wang J, Yao YG. 2012. Genome of the Chinese tree shrew. *Nat Commun*, 4:1426 (DOI: 10.1038/ncomms2416).

Frost MR, Norton TT. 2012. Alterations in protein expression in tree shrew sclera during development of lens-induced myopia and recovery. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* **53**(1): 322-336.

Fuchs E. 2005. Social stress in tree shrews as an animal model of depression: an example of a behavioral model of a CNS disorder. *CNS Spectr,* **10**(3): 182-190.

Fuchs E, Schumacher M. 1990. Psychosocial stress affects pineal function in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). *Physiol Behav,* **47**(4): 713-717.

Fuchs E, Flugge G. 2002. Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. *Pharmacol Biochem Behav,* **73**(1): 247-258.

Glebe D, Aliakbari M, Krass P, Knoop EV, Valerius KP, Gerlich WH. 2003. Pre-S1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J Virol,* **77**(17): 9511-9521.

Goldstein B, Giroir B, Randolph A. 2005. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med,* **6**(1): 2-8.

Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LAM, Fuchs E. 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci,* **17**(7): 2492-2498.

Hallstrom BM, Janke A. 2010. Mammalian evolution may not be strictly bifurcating. *Mol Biol Evol,* **27**(12): 2804-2816.

Han JB, Zhang GH, Duan Y, Ma JP, Zhang XH, Luo RH, Lü LB, Zheng YT. 2011. Sero-epidemiology of six viruses natural infection in *Tupaia belangeri chinensis*. *Zool Res,* **32**(1): 11-16. [韩建保, 张高红, 段勇, 马建平, 张喜鹤, 罗荣华, 吕龙宝, 郑永唐. 2011. 中缅树鼩自然感染六种病毒的血清流行病学. 动物学研究, **32**(1): 11-16.]

Hofmann W, Möller P, Schwaier A, Flügel RM, Zöller L, Darai G. 1981. Malignant tumours in *Tupaia* (tree shrew). *J Med Primatol,* **10**(2-3): 155-163.

Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. Medical progress: the pathophysiology and treatment of sepsis. *New Engl J Med,* **348**(2): 138-150.

Ishiko S, Yoshida A, Mori F, Abiko T, Kitaya N, Kojima M, Saito K. 1997. Early ocular changes in a tree shrew model of diabetes. *J Jpn Ophthalmol Soc,* **101**: 19-23.

Janečka JE, Miller W, Pringle TH, Wiens F, Zitzmann A, Helgen KM, Springer MS, Murphy WJ. 2007. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. *Science,* **318**(5851): 792-794.

Jöhren O, Flügge G, Fuchs E. 1994. Hippocampal glucocorticoid receptor expression in the tree shrew: regulation by psychosocial conflict. *Cell Mol Neurobiol,* **14**(3): 281-296.

Li QF, Ding MQ, Wang H, Mao Q, Wu CQ, Zheng H, Gu CH, Wang YM. 1995. The infection of hepatitis D virus in adult Tupaia. *Nat Med J Chn,* **75**(10): 611-613. [李奇芬, 丁明权, 王洪, 毛青, 吴纯清, 郑红, 顾长海, 王宇明. 1995. 树鼩感染丁型肝炎病毒的实验研究. 中华医学杂志, **75**(10): 611-613.]

Li RX, Xu W, Wang Z, Liang B, Wu JR, Zeng R. 2012. Proteomic characteristics of the liver and skeletal muscle in the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). *Protein Cell,* **3**(9): 691-700.

Li SA, Lee WH, Zhang Y. 2012. Two bacterial infection models in tree shrew for evaluating the efficacy of antimicrobial agents. *Zool Res,* **33**(1): 1-6.

Li SQ, Meng Q, Zhang L. 1999. Experimental therapy of a platelet-activating factor antagonist (ginkgolide B) on photochemically induced thrombotic cerebral ischaemia in tree shrews. *Clin Exp Pharmacol Physiol,* **26**(10): 824-825.

Li Y, Su JJ, Yang C, Cao J, Ou C, Liang L, Yang F, Wang Q. 2011. Progress on establishment of tree shrew (Tupaia) chronic infection with HBV in vivo. *Zool Res,* **32**(1): 104-108. [李瑗, 苏建家, 杨春, 曹骥, 欧超, 梁亮, 杨芳, 王琦. 2011. 乙型肝炎病毒树鼩体内慢性感染模型的研究历程和展望. 动物学研究, **32**(1): 104-108.]

Li Y, Su JJ, Qin LL, Egner PA, Wang JS, Groopman JD, Kensler TW, Roebuck BD. 2000. Reduction of aflatoxin B_1 adduct biomarkers by oltipraz in the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). *Cancer Lett,* **154**(1): 79-83.

Li Y, Qin X, Cui JF, Dai Z, Kang XN, Yue HY, Zhang Y, Su JJ, Cao J, Ou C, Yang C, Duan XX, Yue HF, Liu YK. 2008. Proteome analysis of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) and functional identification of candidate protein peroxiredoxin II. *Proteomics,* **8**(7): 1490-1501.

Liang L, Li Y, Yang C, Cao J, Su JJ, Chen MW, Ban KC, Ou C, Duan XX, Yue HF. 2006. Perinatal and young tree shrews infected with human hepatitis B virus. *Chn J Zoon,* **22**(8): 792-795. [梁亮, 李瑗, 杨春, 曹骥,

苏建家, 陈茂伟, 班克臣, 欧超, 段小娴, 岳惠芬. 2006. 用人工繁育的围生期和幼年树鼩感染人乙型肝炎病毒的初步研究. 中国人兽共患病学报, **22**(8): 792-795.]

Lindblad-Toh K, Garber M, Zuk O, Lin MF, Parker BJ, Washietl S, Kheradpour P, Ernst J, Jordan G, Mauceli E, Ward LD, Lowe CB, Holloway AK, Clamp M, Gnerre S, Alfoldi J, Beal K, Chang J, Clawson H, Cuff J, Di Palma F, Fitzgerald S, Flicek P, Guttman M, Hubisz MJ, Jaffe DB, Jungreis I, Kent WJ, Kostka D, Lara M, Martins AL, Massingham T, Moltke I, Raney BJ, Rasmussen MD, Robinson J, Stark A, Vilella AJ, Wen JY, Xie XH, Zody MC, Worley KC, Kovar CL, Muzny DM, Gibbs RA, Warren WC, Mardis ER, Weinstock GM, Wilson RK, Birney E, Margulies EH, Herrero J, Green ED, Haussler D, Siepel A, Goldman N, Pollard KS, Pedersen JS, Lander ES, Kellis M, Inst B, Med BC, Univ W. 2011. A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals. *Nature,* **478**(7370): 476-482.

Liu XH, Yao YG. 2013. Characterization of 12 polymorphic microsatellite markers in the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). *Zool Res,* **34** (E2)：E63-E69.

Liu Z, Mao Q, Wang YM, Li QF. 1998. An experimental study on infection of hepatitis C virus in adult Tupaiae. *J Third Mili Med Univ,* **12**(6): 472-475. [刘志, 毛青, 王宇明, 李奇芬. 1998. 丙型肝炎病毒感染成年树鼩的实验研究. 第三军医大学学报, **12**(6): 472-475.]

Lucassen PJ, Fuchs E, Czeh B. 2004. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry,* **55**(8): 789-796.

Ma XT, Li FL, Jiang HJ, Lee WH, Zhang Y, Du TY. 2011. Detection and comparison of physiological indexes in the wild and laboratory tree shrew. *Zool Res,* **32**(1): 4-10. [马旭通, 李福林, 蒋宏君, 李文辉, 张云, 杜廷义. 2011. 野生和人工繁育树鼩部分生理指标检测与比较. 动物学研究, **32**(1): 4-10.]

Magariños AM, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. 1996. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci,* **16**(10): 3534-3540.

McBrien NA, Norton TT. 1994. Prevention of collagen crosslinking increases form-deprivation myopia in tree shrew. *Exp Eye Res,* **59**(4): 475-486.

McBrien NA, Arumugam B, Metlapally S. 2012. The effect of daily transient +4 D positive lens wear on the inhibition of myopia in the tree shrew. *Invest Ophth Vis Sci,* **53**(3): 1593-1601.

Nie WH, Fu BY, O'Brien PC, Wang JH, Su WT, Tanomtong A, Volobouev V, Ferguson-Smith MA, Yang FT. 2008. Flying lemurs-the 'flying tree shrews'? Molecular cytogenetic evidence for a scandentia-dermoptera sister clade. *BMC Biol,* **6**: 18.

Norton TT. 1999. Animal models of myopia: learning how vision controls the size of the eye. *ILAR J,* **40**(2): 59-77.

Pang QF, Wan XB, Xu AY, Wang ZM, Wang GX, Zhu BY, Zhang XS. 1981. Hepatitis B virus (HBV) infection in the experimental tree shrews (Abstract). *J Med Res,* (9): 11-12. [庞其方, 万新邦, 胥爱源, 王祖铭, 王桂香, 朱宝友, 张新生. 1981. 乙型肝炎病毒(HBV)感染树鼩的实验研究(摘要). 医学研究通讯, (9): 11-12.]

Park US, Su JJ, Ban KC, Qin LL, Lee EH, Lee YI. 2000. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in tree shrew hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus infection and intake of aflatoxin B1. *Gene,* **251**(1): 73-80.

Pawlik M, Fuchs E, Walker LC, Levy E. 1999. Primate-like amyloid-beta sequence but no cerebral amyloidosis in aged tree shrews. *Neurobiol Aging,* **20**(1): 47-51.

Peng YZ, Ye ZZ, Zou RJ, Wang YX, Tian BP, Ma YY, Shi LM. 1991. Biology of Chinese Tree Shrews [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press. [彭燕章, 叶智彰, 邹如金, 王应祥, 田保平, 马原野, 施立明. 1991. 树鼩生物学. 昆明: 云南科技出版社.]

Rao MS, Reddy JK. 1980. Carcinogenicity of 2, 2'-dihydroxy-di-npropylnitrosamine in the tree shrew (*Tupaia glis*): light and electron microscopic features of pulmonary adenomas. *J Natl Cancer Inst,* **65**(4): 835-840.

Reddy JK, Svoboda DJ, Rao MS. 1976. Induction of liver tumors by aflatoxin B1 in the tree shrew (*Tupaia glis*), a nonhuman primate. *Cancer Res,* **36**(1): 151-160.

Schmitz J, Ohme M, Zischler H. 2000. The complete mitochondrial genome of *Tupaia belangeri* and the phylogenetic affiliation of scandentia to other eutherian orders. *Mol Biol Evol,* **17**(9): 1334-1343.

Schwaier A. 1979. Tupaias (tree shrews)-a new animal model for gallstone research. *Res Exp Med (Berl),* **176**(1): 15-24.

Shen PQ, Zheng H, Liu RW, Chen LL, Li B, He BL, Li JT, Ben KL, Cao YM, Jiao JL. 2011. Progress and prospect in research on laboratory tree shrew in China. *Zool Res,* **32** (1): 109-114. [沈培清, 郑红, 刘汝文, 陈丽玲, 李波, 何保丽, 李进涛, 贲昆龙, 曹筱梅, 角建林. 2011. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望. 动物学研究, **32**(1): 109-114.]

Siegwart JT, Norton TT. 2002. The time course of changes in mRNA levels in tree shrew sclera during induced myopia and recovery. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* **43**(7): 2067-2075.

Su JJ, Yan RQ, Gan YQ, Zhou DN, Huang DR, Huang GH. 1986. A Study of experimental infection by human hepatitis B virus (HBV) in adult tree shrew. *Shanghai Lab Anim Sci,* **6**(4): 193-198. [苏建家, 严瑞琪, 甘友全, 周德南, 黄定瑞, 黄国华. 1986. 人乙型肝炎病毒实验感染成年树鼩的研究. 上海实验动物科学, **6**(4): 193-198.]

Su JJ, Ban KC, Li Y, Qin LL, Wang HY, Yang C, Ou C, Duan XX, Lee YL, Yang RQ. 2004. Alteration of p53 and p21 during hepatocarcinogenesis in tree shrews. *World J Gastroenterol,* **10**(24): 3559-3563.

Vollmayr B, Mahlstedt MM, Henn FA. 2007. Neurogenesis and depression: what animal models tell us about the link. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci,* **257**: 300-303.

Wagner JD, Cline JM, Shadoan MK, Bullock BC, Rankin SE, Cefalu WT. 2001. Naturally occurring and experimental diabetes in cynomolgus monkeys: a comparison of carbohydrate and lipid metabolism and islet pathology. *Toxicol Pathol,* **29**: 142-148.

Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I, Blum HE. 1996. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology,* **24**(1): 1-5.

Wang HP, Zhou YX, Yao ZQ, Hong S, Li GY. 1997. Preliminary study of HCV infected Adult tree shrews. *J Fourth Mili Med Univ,* **18**(4): 375-376. [王海平, 周永兴, 姚志强, 洪沙, 李光玉. 1997. 成年树鼩实验感染丙型肝炎病毒的初步研究. 第四军医大学学报, **18**(4): 375-376.]

Wang J, Zhou QX, Tian M, Yang YX, Xu L. 2011. Tree shrew models: a chronic social defeat model of depression and a one-trial captive conditioning model of learning and memory. *Zool Res,* **32**(1): 24-30.

Wang J, Xu XL, Ding ZY, Mao RR, Zhou QX, Lü LB, Wang LP, Zhang C, Xu L, Yang YX. 2013. Basal physiological indexes in domesticated tree shrews. Zool Res，34 (in press)

Wang J, Zhou QX, Lü LB, Xu L, Yang YX. 2012. A depression model of social defeat etiology using tree shrews. *Zool Res,* **33**(1): 92-98. [王静, 周启心, 吕龙宝, 徐林, 杨跃雄. 2012. 社会竞争失败病因学的抑郁症树鼩模型. 动物学研究, **33**(1): 92-98.]

Wang XX, Li JX, Wang WG, Sun XM, He CY, Dai JJ. 2011. Preliminary investigation of viruses to the wild tree shrews (*Tupaia belangeri chinese*). *Zool Res,* **32**(1): 66-69. [王新兴, 李婧潇, 王文广, 孙晓梅, 何春艳, 代解杰. 2011. 野生中缅树鼩病毒携带情况的初步调查. 动物学研究, **32**(1): 66-69.]

Wang YX. 1987. Taxonomic research on Burma-Chinese tree shrew, *Tupaia belangeri* (Wagner), from Southern China. *Zool Res,* **8**(3): 213-230. [王应祥. 1987. 中国树鼩的分类研究. 动物学研究, **8**(3): 213-230.]

Wu X, Chang Q, Zhang Y, Zou X, Chen L, Zhang L, Liang B. 2013. Relationships between body weight, fasting blood glucose, sex, and age in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). J Anim Physiol Anim Nutr, in press.

Xia H, Wang C, Zhang H, He B, Jiao J, Chen C. 2012. Characterization of spontaneous breast tumor in tree shrews (*Tupaia belangeri chinenesis*). *Zool Res,* **33**(1): 55-59.

Xian S, Huang S, Su JJ, Qin YF, Ou C, Luo ZJ, Wei MY. 2000. A study on experimental diabetes animal models in tree shrews induced by streptozotocin. *J Guangxi Med Univ,* **17**(6): 945-948. [冼苏, 黄松, 苏建家, 秦映芬, 欧超, 罗佐杰, 韦敏怡. 2000. 链脲佐菌素诱导树鼩糖尿病动物模型研究. 广西医科大学学报, **17**(6): 945-948.]

Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, Guillen J, Su JH, Civeira MP, Prieto J. 1998. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology,* **244**(2): 513-520.

Xu L. 2011. Aniaml models of human diseases. *Zool Res,* **32**(1): 1-3. [徐林. 2011. 人类疾病的动物模型. 动物学研究, **32**(1): 1-3.]

Xu L, Fan Y, Jiang XL, Yao YG. 2013. Molecular evidence on the phylogenetic position of tree shrew (*Tupia belangeri*). *Zool Res,* **34** (2):70-76. [许凌, 范宇, 蒋学龙, 姚永刚. 2013. 树鼩进化分类地位的分子证据. 动物学研究, **34** (2):70-76.]

Xu L, Chen SY, Nie WH, Jiang XL, Yao YG. 2012. Evaluating the phylogenetic position of Chinese Tree Shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) based on complete mitochondrial genome: implication for using tree shrew as an alternative experimental animal to primates in biomedical research. *J Genet Genomics,* **39**(3): 131-137.

Yamashita A, Fuchs E, Taira M, Yamamoto K, Hayashi M. 2012. Somatostatin-immunoreactive senile plaque-like structures in the frontal cortex and nucleus accumbens of aged tree shrews and Japanese macaques. *J Med Primat,* **41**(3): 147–157.

Yan H, Zhong GC, Xu GW, He WH, Jing ZY, Gao ZC, Huang Y, Qi YH, Peng B, Wang HM, Fu L, Song M, Chen P, Gao WQ, Ren BJ, Sun YY, Cai T, Feng XF, Sui JH, Li WH. 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife,* **1**: e00049.

Yan RQ, Su JJ, Chen ZY, Liu YG, Gan YQ, Zhou DN. 1984. A preliminary study on experimental infection of human hepatitis B virus in adult tree shrews. *J Guangxi Med Univ,* **1**(1): 10-15. [严瑞琪, 苏建家, 陈志英, 刘由庚, 甘友全, 周德南. 1984. 人乙型肝炎病毒实验感染成年树鼩的初步研究. 广西医学院学报, **1**(1): 10-15.]

Yan RQ, Su JJ, Huang DR, Gan YC, Yang C, Huang GH. 1996. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. II. Experimental induction of hepatocellular carcinoma in tree shrews exposed to hepatitis B virus and aflatoxin B1. *J Cancer Res Clin Oncol,* **122**(5): 289-295.

Yang F, Cao J, Zhang JJ, Wang Q, Su JJ, Yang C, Ou C, Shi JL, Wang DP, Li Y. 2009. Long-term observation of hepatitis B virus (HBV) replication in new-born tree shrews inoculated with HBV. *Chn J Hepatol,* **17**(8): 580-584. [杨芳, 曹骥, 张晶晶, 王琦, 苏建家, 杨春, 欧超, 史俊林, 汪多平, 李瑗. 2009. 新生期树鼩接种人乙型肝炎病毒的长期实验观察. 中华肝脏病杂志, **17**(8): 580-584.]

Zambello E, Fuchs E, Abumaria N, Rygula R, Domenici E, Caberlotto L. 2010. Chronic psychosocial stress alters NPY system: different effects in rat and tree shrew. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,* **34**(1): 122-130.

Zhan MY, Liu CX, Li CM, Zhang WY, Zhu C, Pang QF, Zhao TX, Wang CA, Wang JL, Yu CY, Li SF, Tong ZG, Lin ZH, Niu JQ. 1981. A preliminary study of hepatitis A virus in Chinese Tupaia. *Acta Acad Med Sin,* **3**(3): 148-152. [詹美云, 刘崇相, 李成明, 张文英, 朱纯, 庞其方, 赵同兴, 王长安, 王金利, 余昌晏, 李寿复, 佟智功, 林尊慧, 牛京勤. 1981. 甲型肝炎病毒感染树鼩的初步研究. 中国医学科学院学报, **3**(3): 148-152.]

动 物 学 研 究 2013，Apr. 34(2): 70−76 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2013.02070

树鼩进化分类地位的分子证据

许 凌[1,3], 范 宇[1,3], 蒋学龙[2], 姚永刚[1,4,5,*]

1. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院与云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室， 云南 昆明 650223；
2. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室，云南 昆明 650223；
3. 中国科学院大学，北京 100039；
4. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院灵长类研究中心，云南 昆明 650223；
5. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院树鼩饲养繁殖基地，云南 昆明 650223

摘要：树鼩隶属攀鼩目，广泛分布于东南亚、南亚和中国南部等地区。由于其独特的特点，如体型小、脑-体重比例高、生殖周期短、寿命短和饲养成本低等，在生物医学研究中被认为是可望替代灵长类动物的新型实验动物。然而，关于树鼩与灵长类动物的亲缘关系一直存在争议。明确树鼩的分类地位是创建实验动物的重要研究基础。该文介绍了近年来关于树鼩分类地位探讨的分子证据。在现有的研究中，大部分核 DNA 序列研究，包括近期树鼩全基因组序列分析，都支持树鼩是灵长动物的近缘旁系群，然而绝大部分基于线粒体 DNA 序列的研究却显示树鼩与啮齿动物的亲缘关系更为接近。这样的分歧主要是由于线粒体序列和核基因数据的差异以及不同的算法导致。综合现有不同 DNA 数据的研究结果，作者认为树鼩作为灵长类的近亲这一结论应该成为共识。

关键词：树鼩；系统分类；核基因 DNA；线粒体 DNA
中图分类号：Q959; Q523 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2013)02-0070-07

Molecular evidence on the phylogenetic position of tree shrews

Ling XU [1,3], Yu FAN [1,3], Xue-Long JIANG [2], Yong-Gang YAO [1,4,5,*]

1. *Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province*, *Kunming Institute of Zoology*, *Kunming* 650223, *China;*
2. *State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution*, *Kunming Institute of Zoology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Kunming* 650223, *China*
3. *University of Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China;*
4. *Kunming Primate Research Center, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China;*
5. *Tree Shrew Inbreeding Center, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China*

Abstract: The tree shrew is currently located in the Order Scandentia and is widely distributed in Southeast Asia, South Asia, and South China. Due to its unique characteristics, such as small body size, high brain-to-body mass ratio, short reproductive cycle and life span, and low-cost of maintenance, the tree shrew has been proposed as an alternative experimental animal to primates in biomedical research. However, there is unresolved debate regarding the phylogenetic affinity of tree shrews to primates and their phylogenetic position in Euarchontoglires. To help settle this debate, we summarized the available molecular evidence on the phylogenetic position of the tree shrew. Most nuclear DNA data, including recent genome data, suggested that the tree shrew belongs to the Euarchonta clade harboring primates and flying lemurs (colugos). However, analyses of mitochondrial DNA (mtDNA) data suggested a close relationship to lagomorphs and rodents. These different clustering patterns could be explained by nuclear gene data and mtDNA data discrepancies, as well as the different phylogenetic approaches used in previous studies. Taking all available conclusions together, the robust data from whole genome of this species supports tree shrews being genetically closely related to primates.

Keywords: Tree shrew; Phylogenetic; Nuclear DNA; Mitochondria DNA

树鼩(tree shrews) 隶属于攀鼩目(Scandentia)，为外形类似于松鼠的一类小型哺乳动物，体重≤320 g,

收稿日期：2012-12-24；接受日期：2013-01-24
基金项目：中国科学院基础前沿研究专项项目(KSCX2-EW-J-23)；863 课题(2012AA021801)；中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-R-11)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: yaoyg@mail.kiz.ac.cn

广泛分布于南亚、东南亚及我国南部 (Corbet & Hill, 1992; Helgen，2005)。其中北树鼩 (*Tupaia belangeri*；亦称中缅树鼩)是攀鼩目在我国的唯一代表，头体长 140～230 mm，成年体重 80～200 g (Wang，1987)，3～4 月龄性成熟，怀孕期 40～45 d，哺乳期～35 d，一胎产 1～6 只，通常产 3～4 只(Peng et al，1991)。虽然人类对树鼩的研究已有～200 年历史，但直到 20 世纪 80 年代树鼩作为模型动物在生物学方面的研究才引起较多的关注(Sargis, 2004)。树鼩在生理解剖、神经发育、肝炎病毒感染特性及心理应激模式等方面与灵长类，甚至人类高度相似 (Xu et al，2013)，且具有体型小、饲养成本低及群体扩繁快等特点，被广泛应用于人类医学实验研究的诸多领域，尤其是在人类病毒性肝炎模型的研究方面具有独特的疾病模型优势 (Jiao et al，2009; Shen et al，2011)。另外，树鼩拥有哺乳动物中最大的脑-体重比，是研究脑功能和神经退行性疾病的理想模型(Peng et al，1991; Previc, 2009)。如今，作为一类具有潜在应用价值的新型模式动物，树鼩已越来越多地引起人们的关注。

在树鼩被应用于生物医学实验研究诸多领域的同时，对于树鼩自身所处的系统进化分类地位的研究也未曾离开人们的视线。由于根据形态学数据与分子证据得到的结论之间存在显著差异，导致其系统分类地位一直受到争议(Shoshani et al，1996; Olson et al，2004)。为了解决这个问题，研究者纷纷通过利用更有代表性的 DNA 长片段(甚至是树鼩全基因组序列)，建立更多独立的数据集合及结合更多种计算方法等手段来阐明树鼩与其他物种的亲缘关系。这些方法的建立和手段的利用丰富了分子系统发育进化理论的发展，也为各物种分类提供了有效的分子证据。本文通过回顾树鼩的分类地位、探讨各国学者通过不同分子证据，主要是线粒体基因序列和核基因序列数据，以增进人们对树鼩的系统进化分类地位的认知，并全面认识树鼩的进化地位。

1　树鼩的传统分类地位

1.1　树鼩归类于攀鼩目

1780 年，一只树鼩被误认为是松鼠而被准确描述并附绘图，且直到 40 年后才作为哺乳动物的一个独立类群而被认识，并被归入食虫类，如：最早被定名的普通树鼩(*Tupaia glis*)即是作为鼩鼱属的一个物种被命名为 *Sores glis* Diard, 1820。1821 年，Raffles 在描记两新物种的同时以新种 *Tupaia ferruglinea* (*Tupaia glis* 同物异名)为模式种建立了树鼩属(*Tupaia*)(Olson et al，2005)。此后 Gray 于 1825 年以树鼩属为模式属建立树鼩亚科 (Tupaiinae) 并置于鼹科 (Talpidae)，当然此时的鼹科包含了除象鼩(*macroscelids*)以外的所有现生食虫类动物 (Gray，1825)。随着研究的深入，特别是解剖学研究的进展，19 世纪中叶发现原有食虫类动物存在盲肠有(树鼩、象鼩)或无(其他食虫类)的区分，这一发现在进化与分类上的意义部分为 21 世纪初分子系统学研究所证实(Murphy et al，2001)。然而进一步的形态学研究表明树鼩科动物与原始的狐猴类动物在颅骨和生殖系统方面具有相似性，Carlsson (1922)首次提出树鼩与灵长目之间存在着密切关系，其依据是两者在颅骨、牙齿、肌群、胃肠道及生殖系统等方面有很多共同特征，但是这些特征在象鼩或其他食虫类动物中没有出现，因而将树鼩科归入灵长类原猴亚目(Prosimii)。这一假说随后得到基于树鼩头骨、大脑、颅后骨等详细解剖观察数据的支持(Le Gros, 1924)，并且古生物学、分子与形态研究等结果也揭示树鼩被归入灵长目动物(Novacek, 1992; Simpson, 1945)。然而，作为一个独立的类群，树鼩并无现存的近亲，而被认为最好建立一个目级分类单元——攀鼩目(Scandentia)(Butler, 1972; Luckett, 1980)。Zeller (1986)根据树鼩头骨形态发生的研究结果(即：树鼩与灵长类间无联系)强烈支持树鼩科应作为一个独立的目。近年来在哺乳动物高级分类阶元的研究中，分子系统发育研究结果揭示树鼩与皮翼类、灵长类及“食虫类”明显形成了一个自然的独立类群(Murphy et al，2001)。

1.2　争论不休的攀鼩目

在明确攀鼩目为一独立分类单元后，对于攀鼩目在哺乳动物中的系统关系，即其究竟是灵长总目中灵长动物分支成员还是啮齿动物分支成员，仍有不少争议。总体而言大致有以下三种观点：(1) 将皮翼目(Dermoptera)和攀鼩目归为巽他兽类(Sundatheria)的一支而成为灵长目的旁系群(Madsen et al，2001; Murphy et al, 2001)；(2) 攀鼩目与皮翼目动物和灵长目动物共同组成了灵长动物(Euarchonta)，更进一步将灵长目及皮翼目归为灵长形类(Primatomorpha)而成为攀鼩目的旁系群(Janečka et al, 2007)；(3) 认为攀鼩目的树鼩是兔形

目(Lagomorpha)的近缘旁系群 (Arnason et al, 2002)，再加上啮齿目动物一同形成了灵长总目啮齿动物(Glires)分支。这样的争论时至今日，仍然没有得到统一的结论。

目前，攀鼩目被分为2科：白昼活动的树鼩科(Tapaiidae)和黄昏或者晚上活动的笔尾树鼩科(Ptilocercidae)；5属。树鼩科由4属组成，分别是南印树鼩属(*Anathana*)、细尾树鼩属(*Dendrogale*)、树鼩属(*Tupaia*)及菲律宾树鼩属(*Urogale*)，而笔尾树鼩科只有一单型属——笔尾树鼩属(*Ptilocercus*)；20种及 44 亚种，分布于南亚、东南亚及中国南部，其中最大属为树鼩属(*Tupaia*)，有 15 种 40 亚种(Helgen，2005)。然而这样的分类也存在争议，Davis认为这样的划分不可行，因为细尾树鼩属从形态学角度介于笔尾树鼩和其他树鼩之间(Davis, 1938; Olson et al, 2005)。时至今日，对于攀鼩目动物内部的系统进化关系亦还没有一致结论。

北树鼩 (*Tupaia belangeri*)为攀鼩目在我国的唯一代表，分布于克拉地峡(Isthmus of Kra)以北地区，包括泰国、柬埔寨、老挝、越南、缅甸、孟加拉、印度东北部与中国南部。在亚种分类上，Wang (1987) 基于外部毛色化及形态特征比较将中国现生树鼩分为6个亚种，即：滇西亚种(*T. b. chinensis*)、高黎贡山亚种(*T. b. gaoligongensis*)、海南亚种(*T. b. modesta*)、越北亚种 (*T. b. tonquinia*)、滇南亚种(*T. b. yunalis*)及瑶山亚种 (*T. b. yaoshanensis*)。尽管Corbet & Hill (1992)承认了其中的4个亚种，但认为 *chinensis* 和 *modesta* 为同物异名。Helgen (2005)则将北树鼩仅分为2个亚种：*T. b. belangeri* 和 *T. b. chinensis*，当然，他也指出需要对该物种的种内地理分化进行仔细研究。

2 线粒体 DNA 数据揭示树鼩与啮齿目动物是“近亲”

线粒体 DNA (mtDNA)由于具有母系遗传及缺乏重组的特点，被广泛用于研究物种系统发生关系(Arnason et al, 1999; Derchia et al, 1996; Krettek et al, 1995; Rasmussen et al, 1998; Zardoya & Meyer, 1997)。树鼩线粒体全基因组最早由德国灵长类研究中心在2000年测序完成 (Schmitz et al, 2000)，全长16 754个碱基，与已知的哺乳动物线粒体基因组组成基本类似。有趣的是，树鼩线粒体基因组中的 *COXII* 基因和 tRNA-Lys 紧密相连，该特点与啮齿目动物几内亚猪(*Cavia porcellus*)相同，但不同于其他哺乳动物。

Schmitz et al (2000)利用树鼩线粒体 DNA 重链的 12 个蛋白编码序列与皮翼目动物牙买加果蝠(*Artibeus jamaicensis*)，啮齿目动物小家鼠(*Mus musculus*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)，兔形目动物欧兔(*Oryctolagus cuniculus*)、天竺鼠(*Cavia porcellus*)，偶蹄动物马 (*Equus caballus*)、欧洲野牛(*Bos taurus*)以及7个具有代表性的类人猿亚目动物的序列进行系统树构建，并以负鼠(*Didelphis virginiana*)作为外群，通过不同的算法，最终认为树鼩是兔形目动物的近缘旁系群这个结论有较高的可信度。Lin et al (2002) 在研究兔形目和啮齿目动物 mtDNA 基因组的系统发育关系过程中，也发现树鼩与兔形目存在很强的近缘关系，攀鼩目是兔形目的近缘旁系群。但是这样的划分也存在不合理之处，因为这类比较没有包括灵长目的另一类近缘动物——皮翼目动物 (Schmitz et al, 2000)。于是，Arnason et al (2002)通过对 60 个真兽亚纲动物的mtDNA 基因组全序列在核苷酸和蛋白水平上进行的系统进化发育关系分析，发现在有皮翼目动物猫猴(*Cynocephalus variegatus*)的情况下，树鼩与兔形目动物的亲缘关系依然要近于灵长动物。另外，线粒体编码的蛋白共有13个，但是Schmitz et al (2000)的研究中，没有使用由轻链编码的蛋白ND6，这是由于 ND6 蛋白在氨基酸组成上与其他线粒体编码的蛋白相比变异度非常大(Waddell & Shelley, 2003)，很少被用于系统进化分析。有趣的是，利用这样变异度大的蛋白进行系统发育进化分析，显示树鼩与啮齿目动物的亲缘关系依然要更近于灵长动物 (Waddell & Shelley, 2003)。与该结果一致的是， Hudelot et al (2003) 利用数据库中69个物种的线粒体全基因组中的 tRNA 和 rRNA 序列，针对RNA 替换速率的特点 (作为 DNA-氨基酸的中间态的 RNA，其替换速率取决于序列中碱基的热稳定性)，选用似然法中的两种进化模型模拟线粒体RNA 序列中的不同部分(对于配对位点选用配对位点模型；对于非配对位点选用单位点模型)，再加上贝叶斯算法（Bayesian algorithm）和马尔卡夫蒙地卡罗算法（Markov Monte Carlo method， MCMC）以获得最可能的系统进化发育树和后验概率支系，结果也支持树鼩与兔形目动物的亲缘关系更加接近(Jow et al, 2002; Hudelot et al, 2003)。由此看来，

mtDNA 数据分析的结果一致认为树鼩是啮齿目动物的近缘旁系群。

在前期研究中，我们测定了 3 只中国树鼩(*Tupaia belangeri chinensis*)和 1 只马来猫猴(*Galeopterus variegatu*)的 mtDNA 全基因组序列。结合前人报道的灵长动物和其他相关物种的 mtDNA 基因组数据，我们对攀鼩目、皮翼目和灵长目中代表性物种之间的亲缘关系进行了重构。结果显示，中国树鼩和马来猫猴 mtDNA 基因组的基因组织和结构形式与其他哺乳动物的 mtDNA 基因组相似。依据 12 个线粒体蛋白编码基因构建的系统发育树显示攀鼩目动物和兔形目动物之间的关系更加密切，而皮翼目动物和灵长类动物组成姐妹群。该结果与前人基于 mtDNA 数据分析的结果相吻合，基于文献及我们 mtDNA 基因组研究的结果表明，树鼩同灵长类动物的亲缘关系并没有如我们想像的那么接近(Xu et al, 2012)。

树鼩科内部不同种属间的系统发育地位也是一个有趣的问题。Olson et al (2005)利用具有高保守性的线粒体 12*S* rRNA 序列片段，分析了来自多个地域的已报道树鼩物种的系统发育关系，认为笔尾树鼩属是其他树鼩属的姐妹支系，较早与其他属发生分歧；接着是婆罗洲树鼩与其他树鼩科动物发生分歧；但是仍然未分辨出树鼩科内其他属之间的种系关系。

3　核基因数据分析

由于 mtDNA 数据的局限性，来自核基因的数据被较多地应用于树鼩的分类地位探讨。基于单个核基因片段或多个核基因数据集，目前已有较多研究，然而这些研究揭示的结果不尽相同。

3.1　树鼩是皮翼目动物猫猴的近缘旁系群

Madsen et al (2001)通过分析 26 种有胎盘动物长度分别是 5708 bp 和 2947 bp 的 DNA 拼接片段，否定了树鼩与皮翼目动物和灵长目动物共同形成灵长动物这一假说。但这两个 DNA 数据分析的结果不一致：5708 bp 的 DNA 数据支持树鼩与皮翼目动物共同形成近缘旁系群，而 2947 bp 数据显示树鼩作为整个灵长总目动物(包括灵长动物和啮齿动物)的外群更为合适。在同一时期，Murphy et al (2001)利用 16.4 kb 的 DNA 片段(包括 19 个核基因和 3 个线粒体基因)，通过贝叶斯算法和最大似然法对 42 种有胎盘动物和 2 种有袋动物 (作为外群)进行了系统发育关系重建，结果支持树鼩是皮翼目动物的近缘旁系群。另外，Amrine-Madsen et al (2003)采用载脂蛋白 B (*APOB*)基因 (共 26 个外显子，1342 bp)，对 63 个属于真兽亚纲的动物进行了系统发育关系的分析，并将 *APOB* 基因片段同 Murphy et al (2001)研究中 16.4 kb 的 DNA 片段进行拼接串联，通过贝叶斯方法和最大似然法进行分析，结果支持树鼩与皮翼目动物的亲缘关系更加接近，而单独的 *APOB* 基因则支持树鼩与兔形目和啮齿目动物共同组成的啮齿动物分支。灵长总目动物中的染色体图染(chromosome painting)和细胞核型比较分析证实，树鼩的核型相对于人类而言具有很高的衍生性(Müller et al, 1999)。Nie et al (2008)通过染色体图染的方法建立了人和皮翼目动物猫猴的全基因组染色体比较图谱，在确定了 44 个猫猴和人同源性染色体后，通过与已发表染色体图谱相比较，G 带核型(G-banded karyotype)分析认为树鼩与猫猴 (*Galeopterus variegatu*)共享有一个独特的衍生型联接——HSA2q/21，该人类结合片段联接(human syntenic segment association，HSA)提示树鼩与猫猴是姐妹支系，并且这个联接的产生来自于二者相似的常染色体。染色体图染结果支持树鼩是皮翼目动物猫猴的近缘旁系群 (Nie et al, 2008)。

3.2　树鼩与皮翼目动物和灵长目动物共同组成灵长动物

部分报道的核 DNA 研究结果显示树鼩与猫猴亲缘关系较远，猫猴与灵长目动物的亲缘关系更加接近，三者一同形成灵长动物分支。Janečka et al (2007)通过两种独立的方式对灵长总目的进化关系进行了分析：首先对 21 个灵长总目动物的基因组中罕见的外显子插入缺失(共有 197522 个基因外显子)进行了多物种序列比对，其中，有 3 个特异性缺失支持灵长动物的单系起源，但没有任何的特异性缺失将树鼩与猫猴联系在一起，反而猫猴和灵长目共享了 7 个特异性缺失，树鼩与灵长目动物只共享了一个。其次，利用～14 kb 共 19 个核基因拼接片段进行贝叶斯和最大似然法分析，构建的系统发育树支持与灵长目动物最近缘的动物是皮翼目动物猫猴，该结果与 mtDNA 分析结果一致。另外，Killian et al (2001)利用甘露糖 6 磷酸和胰岛素样生长因子 II 序列进行分析的结果也支持树鼩与皮翼目动物和灵长目动物一同形成灵长动物分支，但皮翼目动物与灵长目动物亲缘关系更近。

3.3 树鼩是啮齿动物的近缘旁系群

目前也有核基因数据结果与线粒体数据结果一致的报道，显示树鼩属于啮齿动物。Bailey et al (1992)分析了11个灵长目动物和树鼩等的ε-球蛋白基因(*ε-globin* genes)，结果显示树鼩与兔形目的亲缘关系更加接近。另外，Porter et al (1996)比较了包括树鼩在内的 27 个物种 von Willebrand 因子(von Willebrand factor, vWF)第 28 号外显子序列变异，基于最大简约法分析得到的系统发育树支持树鼩是啮齿动物的近缘旁系群。短分散重复序列(short interspersed elements, SINEs)来源于小 RNA 的复位，通过插入方式存在于所有的真核细胞基因组中，因为 SINE 具有在基因组中拷贝数高及在不同物种中序列的复杂性不同等特点，使得 SINE 成为有效的系统发育分子标记(Kriegs et al, 2007)。SINE 由 7SL RNA 演化而来，并且在所有的灵长动物中都有不同的衍生形式，由单体二聚化形成二聚体(Kriegs et al, 2007)。Alu 二聚化形式仅在灵长目动物中出现，B1 型在啮齿目动物出现，树鼩中出现的 Tu 型单体 (Tu type-m)序列则是 Alu 和 B1 型两种序列的嵌合型 (Nishihara et al, 2002)。通过基因组搜索发现人和树鼩共享 5 个独立的反转录插入，而树鼩与褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、小家鼠(*Mus musculus*)和欧兔(*Oryctolagus cuniculus*)共享了 14 个独立的反转录插入，这提示树鼩与啮齿动物共享更多相同的独特反转录插入(Kriegs et al, 2007)。但由于 Kriegs et al (2007)的研究缺少其他兔形目动物和猫猴的数据，对树鼩具体的进化地位未能提供更多的信息。Hallström & Janke (2010) 应用最大似然法对 31 个哺乳动物的 3364 个同源基因进行构树，结果显示树鼩与啮齿动物亲缘关系更近，但 pSH (Shimodaira-Hasegawa probabilities)检测在一定程度上支持树鼩与灵长目更近，而邻接网络分析(neighbor-net)无法确定树鼩与灵长目和啮齿动物的关系。Meredith et al (2011)基于 26 个基因采用最大似然法和贝叶斯法构建系统发育树，发现树鼩与啮齿动物的亲缘关系更近。

3.4 全基因组数据揭示树鼩是灵长类近亲

Lindblad-Toh et al (2011)利用美国 Broad 研究所公布的 2X 的不完整的树鼩基因组数据重构了 29 个哺乳动物的系统发育关系，显示树鼩是最接近灵长类的动物。在近期的一项研究中，Song et al (2012)利用 447 个核基因重构 37 个物种的系统发育树，并联合物种树的最大假似然评估方法(maximum pseudolikelihood estimation of the species tree，MP-EST)和物种树的平均等级聚集评估方法(species tree estimation using average ranks of coalescence，STAR)对系统发育树进行更精确评估，显示树鼩与灵长类的亲缘关系最为接近。昆明动物研究所利用二代测序技术高质量完成了一只中缅树鼩的全基因组测序，总覆盖度高达 79X。利用树鼩等 15 个物种(其中包括 6 种灵长类动物、2 种啮齿类动物及 1 种兔形类动物)的基因组数据，提取了 2117 个单拷贝基因重构系统发育树。结果表明，无论是用 CDS 序列还是蛋白质序列构树，树鼩均与灵长类聚在一起，与灵长类亲缘最近 (Fan et al, 2013)。基于这些基因估算的分歧时间显示树鼩与灵长类分歧时间大约发生在 90.9 百万年前(million years ago，mya), 而啮齿类与与灵长分歧时间大约发生在 96.4 百万年前 (Fan et al, 2013)。

尽管现有的树鼩的全基因组数据显示树鼩与灵长目动物的亲缘关系最为接近，但由于皮翼目动物猫猴全基因组序列的缺乏，因此我们无法更加细分树鼩在灵长动物分支中的地位。

4 结语

综上所述，不同的研究分别利用线粒体基因序列和核基因序列数据进行系统进化分析，显示的树鼩进化地位有很大的不同。线粒体数据倾向于树鼩作为啮齿类动物的近缘旁系群，与兔形目动物关系最为接近(Adkins & Honeycutt, 1991; Arnason et al, 1999; Schmitz et al, 2000; Xu et al, 2012)。核基因数据则倾向于支持树鼩归入灵长动物分支，但具体类群的聚类关系不同，有人认为树鼩是皮翼目动物猫猴的近缘旁系群(Madsen et al, 2001; Murphy et al, 2001)，有人支持三者都属于灵长动物分支 (Janečka et al, 2007; Killian et al, 2001)，也有人认为树鼩与啮齿动物的亲缘关系较近 (Allard et al, 1996; Bailey et al, 1992; Porter et al, 1996)。全基因组数据显示树鼩与灵长目动物接近(Fan et al, 2013, Song et al, 2012)，但其精确定位有待于猫猴的全基因组序列来比较。

虽然分子遗传和形态证据的矛盾及分子遗传证据内部的矛盾导致最终呈现的树鼩分类地位的差异，但多数研究不排除树鼩与灵长类的亲缘关系。事实上，由于树鼩长期被认为是介于灵长类古老类

型和现代灵长类之间的中间类型，树鼩在形态及分子遗传方面具有古老特征与更为进化的特征共存的特点。一些遗传特征保持与兔形目一致，提示它们来源于共同的祖先；随后攀鼩目与灵长目的祖先进化出部分相同的形态特征(Allard et al, 1996; Liu et al, 2001; Miyamoto, 1996)。因此，不论是用线粒体序列和核基因序列对树鼩进化分类地位的确认都是片面的。单独分析线粒体数据，更多体现的是树鼩与兔形目相似的一面，而选择性分析不同的核基因或者一部分核基因片段也只是抓取到了树鼩进化过程中的某一个或某一时期的特征。因此，或许正如 Janečka et al (2007)和 Nie et al (2008)所指出的：对灵长目动物的形态学和基因组进化的正确认识源于对其旁系群 (猫猴、树鼩)的正确认识。要想获得对树鼩进化地位的全面认识，测定树鼩进化过程中近缘旁系群物种的全基因组，应当是首先需要考虑的问题。

参考文献：

Adkins RM, Honeycutt RL. 1991. Molecular phylogeny of the superorder Archonta. *Proc Natl Acad Sci USA,* **88**(22): 10317-10321.

Allard MW, McNiff BE, Miyamoto MM. 1996. Support for interordinal eutherian relationships with an emphasis on primates and their Archontan relatives. *Mol Phyl Evol,* **5**(1): 78-88.

Amrine-Madsen H, Koepfli KP, Wayne RK, Springer MS. 2003. A new phylogenetic marker, apolipoprotein B, provides compelling evidence for eutherian relationships. *Mol Phyl Evol,* **28**(2): 225-240.

Arnason U, Gullberg A, Janke A. 1999. The mitochondrial DNA molecule of the aardvark, *Orycteropus afer*, and the position of the Tubulidentata in the eutherian tree. *Proc R Soc Lond B,* **266**(1417): 339-345.

Arnason U, Adegoke JA, Bodin K, Born EW, Esa YB, Gullberg A, Nilsson M, Short RV, Xu XF, Janke A. 2002. Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. *Proc Natl Acad Sci USA,* **99**(12): 8151-8156.

Bailey WJ, Slightom JL, Goodman M. 1992. Rejection of the 'flying primate' hypothesis by phylogenetic evidence from the epsilon-globin gene. *Science,* **256**(5053): 86-89.

Butler PM. 1972. The Problem of Insectivore Classification. Edinburgh: Oliver & Boyd.

Carlsson A. 1922. Über die tupaiidae und ihre beziehungen zu den insectivora und den prosimiae. *Acta Zoologica*, **3**(2-3): 227-270.

Corbett GB, Hill JE. 1992. The Mammals of the Indomalay Region: A Systematic Review. Oxford: Natural History Museum Publications; Oxford University Press.

Davis DD. 1938. Notes on the anatomy of the treeshrew dendrogale// Davis DD. Chicago: Field Museum of Natural History: 383-404

Derchia AM, Gissi C, Pesole G, Saccone C, Arnason U. 1996. The guinea-pig is not a rodent. *Nature,* **381**(6538): 597-600.

Fan Y, Huang Z-Y, Cao C-C, Chen C-S, Chen Y-X, Fan D-D, He J, Hou H-L, Hu L, Hu X-T, Jiang X-T, Lai R, Lang Y-S, Liang B, Liao S-G, Mu D, Ma Y-Y, Niu Y-Y, Sun X-Q, Xia J-Q, Xiao J, Xiong Z-Q, Xu L, Yang L, Zhang Y, Zhao W, Zhao X-D, Zheng Y-T, Zhou J-M, Zhu Y-B, Zhang G-J, Wang J, Yao Y-G. 2013. Genome of the Chinese tree shrew. *Nat Commun,* 4: 1426 (DOI: 10.1038/ncomms2416).

Gray JE. 1825. An outline of an attempt at the disposition of Mammalia into tribes and families, with a list of the genera apparently appertaining to each tribe. *Ann Phil*, 10: 337-343.

Hallström BM, Janke A. 2010. Mammalian evolution may not be strictly bifurcating. *Mol Biol Evol,* **27**(12): 2804-2816.

Helgen KM. 2005. Order scandentia// Wilson DE, Reeder DM. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. 3rd ed. Maryland: Johns Hopkins University Press: 104-109.

Hudelot C, Gowri-Shankar V, Jow H, Rattray M, Higgs PG. 2003. RNA-based phylogenetic methods: application to mammalian mitochondrial RNA sequences. *Mol Phyl Evol,* **28**(2): 241-252.

Janečka JE, Miller W, Pringle TH, Wiens F, Zitzmann A, Helgen KM, Springer MS, Murphy WJ. 2007. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. *Science,* **318**(5158): 792-794.

Jiao JL, Liu RW, Chen LL, LI B, He BL, Zheng H, Shen PQ. 2009. The development and use of tree shrew resource and its standards research-the strategic discussion for laboratory animal resource development in China. *Chin J Comp Med,* **19**(7): 73-78. [角建林，刘汝文，陈丽玲，李波，何保丽，郑红，沈培清. 2009. 树鼩资源的开发利用与标准化研究——我国实验动物资源建设发展战略探讨. 中国比较医学杂志, **19**(7): 73-78.]

Jow H, Hudelot C, Rattray M, Higgs PG. 2002. Bayesian Phylogenetics Using an RNA Substitution Model Applied to Early Mammalian Evolution. *Mol Biol Evol,* **19**(9): 1591-1601.

Killian JK, Buckley TR, Stewart N, Munday BL, Jirtle RL. 2001. Marsupials and Eutherians reunited: genetic evidence for the Theria hypothesis of mammalian evolution. *Mamm Genome,* **12**(7): 513-517.

Krettek A, Gullberg A, Arnason U. 1995. Sequence analysis of the complete mitochondrial DNA molecule of the hedgehog, *Erinaceus europaeus*, and the phylogenetic position of the Lipotyphla. *J Mol Evol,* **41**(6): 952-957.

Kriegs JO, Churakov G, Jurka J, Brosius J, Schmitz J. 2007. Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates. *Trends Genet,* **23**(4): 158-161.

Le Gros CWE. 1924. On the brain of the tree-shrew (*Tupaia minor*). *Proc Zool Soc London,* **94**(4): 1053-1074.

Lin YH, Waddell PJ, Penny D. 2002. Pika and vole mitochondrial genomes increase support for both rodent monophyly and glires. *Gene,* **294**(1-2): 119-129.

Lindblad-Toh K, Garber M, Zuk O, Lin MF, Parker BJ, Washietl S, Kheradpour P, Ernst J, Jordan G, Mauceli E, Ward LD, Lowe CB, Holloway AK, Clamp M, et al. 2011. A high-resolution map of human evolutionary

constraint using 29 mammals. *Nature,* **478**(7370): 476-482.

Liu FGR, Miyamoto MM, Freire NP, Ong PQ, Tennant MR, Young TS, Gugel KF. 2001. Molecular and morphological supertrees for eutherien (placental) mammals. *Science,* **291** (5509): 1786-1789.

Luckett WP. 1980. The Suggested Evolutionary Relationships and Classification of Tree Shrews. New York & London: Plenum Press.

Madsen O, Scally M, Douady CJ, Kao DJ, DeBry RW, Adkins R, Amrine HM, Stanhope MJ, de Jong WW, Springer MS. 2001. Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals. *Nature,* **409**(6820): 610-614.

Meredith RW, Janečka JE, Gatesy J, Ryder OA, Fisher CA, Teeling EC, Goodbla A, Eizirik E, Simão TLL, Stadler T, Rabosky DL, Honeycutt RL, Flynn JJ, Ingram CM, Steiner C, Williams TL, Robinson TJ, Burk-Herrick A, Westerman M, Ayoub NA, Springer MS, Murphy WJ. 2011. Impacts of the cretaceous terrestrial revolution and KPg extinction on mammal diversification. *Science,* **334**(6055): 521-524.

Miyamoto MM. 1996. A congruence study of molecular and morphological data for Eutherian mammals. *Mol Phyl Evol,* **6**(3): 373-390.

Müller S, Stanyon R, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Plesker R, Wienberg J. 1999. Defining the ancestral karyotype of all primates by multidirectional chromosome painting between tree shrews, lemurs and humans. *Chromosoma,* **108**(6): 393-400.

Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ, Madsen O, Scally M, Douady CJ, Teeling E, Ryder OA, Stanhope MJ, de Jong WW, Springer MS. 2001. Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. *Science,* **294**(5550): 2348-2351.

Nie WH, Fu BY, O'Brien PCM, Wang JH, Su WT, Tanomtong A, Volobouev V, Ferguson-Smith MA, Yang FT. 2008. Flying lemurs-The 'flying tree shrews'? Molecular cytogenetic evidence for a Scandentia-Dermoptera sister clade. *BMC Biology,* **6**(1): 18.

Nishihara H, Terai Y, Okada N. 2002. Characterization of novel Alu- and tRNA-related SINEs from the tree shrew and evolutionary implications of their origins. *Mol Biol Evol,* **19**(11): 1964-1972.

Novacek MJ. 1992. Mammalian Phylogeny-Shaking the Tree. *Nature,* **356**(6365): 121-125.

Olson LE, Sargis EJ, Martin RD. 2004. Phylogenetic relationships among treeshrews (Scandentia): A review and critique of the morphological evidence. *J Mamm Evol,* **11**(1): 49-71.

Olson LE, Sargis EJ, Martin RD. 2005. Intraordinal phylogenetics of treeshrews (Mammalia: Scandentia) based on evidence from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Mol Phyl Evol,* **35**(3): 656-673.

Peng YZ, Ye ZZ, Zou RJ, Wang YX, Tian BP, Ma YY, Shi LM. 1991. Biology of Chinese Tree Shrews (*Tupaia Belangeri Chinensis*). Kunming: Yunnan Science and Technology Press. [彭燕章, 叶智章, 邹如金，王应祥，田保平，马原野，施立明. 1991. 树鼩生物学. 昆明: 云南科技出版社.]

Porter CA, Goodman M, Stanhope MJ. 1996. Evidence on mammalian phylogeny from sequences of exon 28 of the von Willebrand factor gene. *Mol Phyl Evol,* **5**(1): 89-101.

Previc FH. 2009. The Dopaminergic Mind in Human Evolution and History. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo, Delhi: Cambridge University Press.

Rasmussen AS, Janke A, Arnason U. 1998. The mitochondrial DNA molecule of the hagfish (*Myxine glutinosa*) and vertebrate phylogeny. *J Mol Evol,* **46**(4): 382-388.

Sargis EJ. 2004. New views on tree shrews: The role of Tupaiids in primate supraordinal relationships. *Evolutionary Anthropology: Issues, News Rev,* **13**(2): 56-66.

Schmitz J, Ohme M, Zischler H. 2000. The complete mitochondrial genome of *Tupaia belangeri* and the phylogenetic affiliation of Scandentia to other eutherian orders. *Mol Biol Evol,* **17**(9): 1334-1343.

Shen PQ, Zheng H, Liu RW, Chen LL, Li B, He BL, Li JT, Ben KL, Cao YM, Jiao JL. 2011. Progress and prospect in research on laboratory tree shrew in China. *Zool Res,* **32**(1): 109-114. [沈培清, 郑红, 刘汝文, 陈丽玲, 李波, 何保丽, 李进涛, 贲昆龙, 曹筱梅, 角建林. 2011. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望. 动物学研究, **32**(1): 109-114.]

Shoshani J, Groves CP, Simons EL, Gunnell GF. 1996. Primate phylogeny: morphological vs molecular results. *Mol Phyl Evol,* **5**(1): 102-154.

Simpson GG. 1945. The principles of classification and a classification of Mammals. *Bull Amer Mus Nat Hist,* **85**: 1-350.

Song S, Liu L, Edwards SV, Wu S. 2012. Resolving conflict in eutherian mammal phylogeny using phylogenomics and the multispecies coalescent model. *Proc Natl Acad Sci USA,* **109**(37): 14942-14947.

Waddell PJ, Shelley S. 2003. Evaluating placental inter-ordinal phylogenies with novel sequences including RAG1, gamma-fibrinogen, ND6, and mt-tRNA, plus MCMC-driven nucleotide, amino acid, and codon models. *Mol Phylogenet Evol,* **28**(2): 197-224.

Wang YX. 1987. Taxonomic research on Burma-Chinese tree shrew, *Tupaia belangeri* (Wagner), from Southern China. *Zool Res,* **8**(3): 213-230. [王应祥. 1987. 中国树鼩的分类研究. 动物学研究, **8**(3): 213-230.]

Xu L, Chen S-Y, Nie W-H, Jiang X-L, Yao Y-G. 2012. Evaluating the phylogenetic position of Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) based on complete mitochondrial genome: implication for using tree shrew as an alternative experimental animal to primates in biomedical research. *J Genet Genomics,* **39**(3): 131-137.

Xu L, Zhang Y, Liang B, Lü L-B, Chen C-S, Chen Y-B, Zhou J-M, Yao Y-G. 2013. The tree shrew under the spot light: emerging models of human diseases. *Zool Res*, **34**（2）: 59-69. [徐林, 张云，梁斌, 吕龙宝, 陈策实, 陈勇彬, 周巨民, 姚永刚. 2013. 树鼩实验动物和人类疾病的树鼩模型研究概述. 动物学研究，**34**（2）：59-69.]

Zardoya R, Meyer A. 1997. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of a "living fossil", the coelacanth (*Latimeria chalumnae*). *Genetics,* **146**(3): 995-1010.

Zeller UA. 1986. Ontogeny and cranial morphology of the tympanic region of the Tupaiidae, with special reference to *Ptilocercus*. *Folia Primatol (Basel)*, 47(2-3): 61-80.

动 物 学 研 究 2013，Apr. 34(2): 77−88 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2013.02077

平顶猴在 HIV/AIDS 动物模型中的应用及研究进展

雷爱华 [1,2]，庞 伟 [1]，张高红 [1]，郑永唐 [1,2,3,4,*]

1. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室, 云南 昆明 650223；
2. 中国科学院大学, 北京 100049；
3. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院昆明灵长类研究中心, 云南 昆明 650223；
4. 中国科学院昆明动物研究所-香港中文大学生物资源与疾病分子机理联合实验室, 云南 昆明 650223

摘要：非人灵长类动物模型在 HIV-1 致病机制研究以及抗 AIDS 药物和疫苗研发中具有重要作用。由于缺乏 HIV-1 直接感染的动物，SIV/SHIV 猕猴模型是目前 AIDS 研究中应用最为广泛的动物模型。虽然 SIV/SHIV 猕猴模型与人 AIDS 具有一定的相似性，但 SIV/SHIV 与 HIV-1 间的遗传差异较大，致使 SIV/SHIV 猕猴模型存在很多局限性。创建合适的非人灵长类动物模型仍然是 HIV/AIDS 研究中的热点和难点。平顶猴是目前唯一可以被 HIV-1 感染的旧大陆猴，在 HIV-1 静脉传播和性传播模型研究中具有许多优势。该文综述了 SIV、HIV、SHIV 和 HSIV 通过静脉和黏膜途径感染平顶猴的特征，并简要介绍了病毒在平顶猴细胞中复制的分子机制以及建立平顶猴 AIDS 模型的限制因素和前景。

关键词：HIV；SIV；SHIV；HSIV；平顶猴；动物模型
中图分类号：Q291; Q959.848 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2013)02-0077-12

Use and research of pigtailed macaques in nonhuman primate HIV/AIDS models

Ai-Hua LEI [1,2], Wei PANG [1], Gao-Hong ZHANG [1], Yong-Tang ZHENG [1,2,3,4,*]

1. *Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province*, *Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences*, *Kunming* 650223, *China*
2. *University of Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*
3. *Kunming Primate Research Center, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China*
4. *KIZ-CUHK Joint Laboratory of Bioresources and Molecular Research in Common Diseases, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China*

Abstract: Nonhuman primate animal models play an important role in studying HIV-1 pathogenesis, developing antiviral drugs and vaccines. Due to the lack of animals that can be directly infected with HIV-1, SIV/SHIV-infected macaques have been widely used in AIDS research. Although these models are somewhat similar to human AIDS, there are many limitations due to genetic differences between SIV/SHIV and HIV-1. Developing a suitable nonhuman primate animal model is still an important topic in HIV/AIDS research. The pigtailed macaque is the only primate in Old World monkeys that can be infected with HIV-1 and offer many benefits as HIV-1 intravenous and sexual transmission models. Here we reviewed the characteristics of pigtailed macaque models infected by SIV, HIV, SHIV, and HSIV *via* intravenous and mucosal routes. In addition, we briefly introduced the molecular mechanisms of viral replication in pigtailed macaque cells, and discussed the limitations and prospects of pigtailed macaque models in AIDS research.

Keywords: HIV; SIV; SHIV; HSIV; Pigtailed macaques; Animal models

非人灵长类(nonhuman primates, NHP)动物在组织结构、免疫、生理和代谢等方面与人类非常相似，对于研究 HIV/AIDS 传播和致病机制以及抗 AIDS 药物和疫苗具有不可替代的作用(Li et al,

收稿日期：2012-11-27；接受日期：2013-01-07
基金项目：国家自然科学基金 (81172876, U0832601, 81273251, U1202228)；国家重大科学研究计划 (2012CBA01305)；国家科技重大专项 (2013ZX10001-002)和中国科学院知识创新工程重要方向 (KSCX2-EW-R-13)
[*]通信作者(Corresponding author)，E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn
第一作者简介：雷爱华，男，硕士研究生，主要从事 AIDS 灵长类动物模型研究。

2007a; Zhang et al, 2007; Van Rompay, 2012; Zhu et al, 2010)。在NHP动物中，黑猩猩(chimpanzee, *Pan troglodytes*)和长臂猿(gibbon, *Nomascus nasutus*)能被HIV-1感染，但感染后不发病；且由于它们是濒危珍贵动物，作为AIDS模型动物受到了极大限制。旧大陆猴(Old World monkey)中的猕猴(rhesus macaques, *Macaca mulatta*)和食蟹猴(cynomolgus macaques, *Macaca fascicularis*)均不能被HIV-1感染，而能被猴免疫缺陷病毒 (simian immunodeficiency virus, SIV)和人/猴嵌合免疫缺陷病毒(simian-human immunodeficiency virus, SHIV)所感染，感染后会出现类似人AIDS症状。目前，SIV/SHIV猕猴模型是最常用的AIDS动物模型(Ambrose et al, 2007)。然而，SIV/SHIV与HIV-1之间存在较大的遗传差异，在评价药物及疫苗有效性和安全性上存在局限性 (Ambrose et al, 2007; Van Rompay, 2012; Zhang et al, 2007)。因此，构建合适的NHP动物模型仍然是HIV/AIDS研究中的热点和难点。

平顶猴(pigtailed macaques)，又称豚尾猴，是目前唯一报道可以被HIV-1感染的旧大陆猴(Agy et al, 1992; Hu, 2005)，作为HIV/AIDS模型动物具有许多优势。本文综述了平顶猴在HIV/AIDS动物模型上的研究进展及其相关分子机制，阐述了SIV、HIV、SHIV和HSIV通过不同途径感染平顶猴的特点，并结合我们实验室的工作探讨了平顶猴AIDS模型的限制因素和前景。

1 平顶猴HIV/AIDS动物模型的优点

猴科猕猴属的平顶猴、猕猴 (包括印度猕猴和中国猕猴)和食蟹猴是目前HIV/AIDS研究中应用最为广泛的NHP动物(Baroncelli et al, 2008; Hatziioannou & Evans, 2012)。平顶猴在～500万年前与猕猴和食蟹猴从进化上产生了分歧，而猕猴和食蟹猴之间则在240万年后才出现分歧(Baroncelli et al, 2008; Morales & Melnick, 1998)。2001年动物分类学家将平顶猴中的3个亚种提升为3个不同的种：巽他平顶猴 (sunda pigtailed macaques, *M. nemestrina*)、北平顶猴 (northern pigtailed macaques, *M. leonina*)和明打威猴 (mentawai macaques, *M. pagensis*) (Groves, 2001; Gippoliti, 2001; Kuang et al, 2009)。在地理分布上，巽他平顶猴(*M. nemestrina*)主要分布于马来西亚半岛南部、苏门答腊及波罗洲；明打威猴 (*M. pagensis*)主要生活在明打威群岛；北平顶猴 (*M. leonina*)主要栖息在我国云南西南部和西藏东南部以及缅甸、泰国、马来半岛和印度支那地区等地 (Rosenblum et al, 1997)。目前尚无这3种平顶猴对SIV/HIV病毒易感性是否存在差异的研究报道。迄今为止，几乎所有SIV/HIV感染平顶猴模型的研究报道使用的平顶猴均为巽他平顶猴 (*M. nemestrina*)。

与猕猴和食蟹猴相比，平顶猴在HIV/AIDS动物模型方面具有许多优势。首先，在HIV-1性传播模型方面，平顶猴体型较大，生殖道组织结构及月经周期与人很相似，全年均可繁殖，非常适合作为性传播疾病模型动物 (Patton et al, 2009)。尽管食蟹猴全年可繁殖，但是其体型较小，阴道腔和子宫颈直径也较小，给阴道镜检查和多次活检带来了很大的困难 (Patton et al, 2004)。猕猴的繁殖则具有明显的季节性。目前，平顶猴在阴道毛滴虫，沙眼衣原体等性传播疾病方面的相应模型已经建立 (Patton et al, 2001; Patton et al, 2006)。鉴于其它性传播疾病会增加HIV-1感染人的风险，Henning et al (2011)首次成功建立了$\mathrm{SHIV}_{\mathrm{SF162P3}}$、沙眼衣原体与阴道毛滴虫的共感染平顶猴模型，临床症状与人类似，为平顶猴在杀微生物剂等方面的应用提供了技术支持。其次，在HIV-1静脉传播模型方面，由于病毒限制因子TRIM5α的存在，猕猴和食蟹猴对HIV-1感染存在一种进入后限制感染的现象 (Stremlau et al, 2004)。与猕猴和食蟹猴不同，平顶猴可被HIV-1感染 (Agy et al, 1992; Bosch et al, 2000)。我们实验室首次发现平顶猴不表达限制HIV-1复制的TRIM5α蛋白，而是形成TRIM5-CypA融合模式，且融合产物不限制HIV-1的复制，在细胞和分子水平上证实了北平顶猴是较理想的艾滋病模型动物 (Cao et al, 2012; Kuang et al, 2009; Liao et al, 2007)。此外，近年来发现平顶猴对simian tropic (st) HIV-1和HSIV-vif易感(Hatziioannou et al, 2009; Hatziioannou & Evans, 2012; Thippeshappa et al, 2011)，预示平顶猴在HIV-1/AIDS动物模型的研究中具有较好前景。

2 HIV/AIDS平顶猴模型

当前，静脉吸毒和黏膜传播 (同性传播和异性传播)是HIV-1传播的两种主要途径。在感染途径方面，Zhou et al (2013)发现通过血液途径感染的

HIV-1 患者比通过黏膜途径感染的患者具有更强的 T 细胞免疫应答。然而，在猴 AIDS 模型上，一些研究发现静脉和黏膜感染两种途径对于感染后病毒载量和 $CD4^+$ T 细胞的变化影响不大 (Batten et al, 2006; Laurén et al, 2006)。同时也有研究发现 HIV/SIV 的接种途径会影响病毒在体内的遗传变异及致病性 (Couedel-Courteille et al, 2003; Ambrose et al, 2001)。这也许与不同病毒感染不同非人灵长类动物有关。以下重点介绍 SIV、HIV、SHIV 和 HSIV 通过不同途径感染平顶猴的特征及模型的应用价值。

2.1　SIV 感染平顶猴

现已发现有～40 种物种特异性(species specificity)的 SIV 存在于不同的非洲猴中，在进化和来源上至少可以分为 SIV_{sm}、SIV_{agm}、SIV_{gsn}、SIV_{cpz}、SIV_{lhoest}、SIV_{col} 和 SIV_{mnd} 等 7 大支系(Klatt et al, 2012b)。SIV 感染其自然宿主后，尽管宿主体内的病毒载量较高但通常不发病(Hatziioannou & Evans, 2012; Klatt et al, 2012b)。SIV 和 HIV-2 的基因组序列相似性为～80%，而与 HIV-1 的基因组序列相似性仅为 45% (Baroncelli et al, 2008) ，SIV 与 HIV-1 的基因结构图如图 1。由于 SIV 感染的猕猴出现肠系膜淋巴结处记忆 $CD4^+$ T 细胞减少和 AIDS 样临床症状 (Lackner & Veazey, 2007)，因而被大量用于 AIDS 研究。

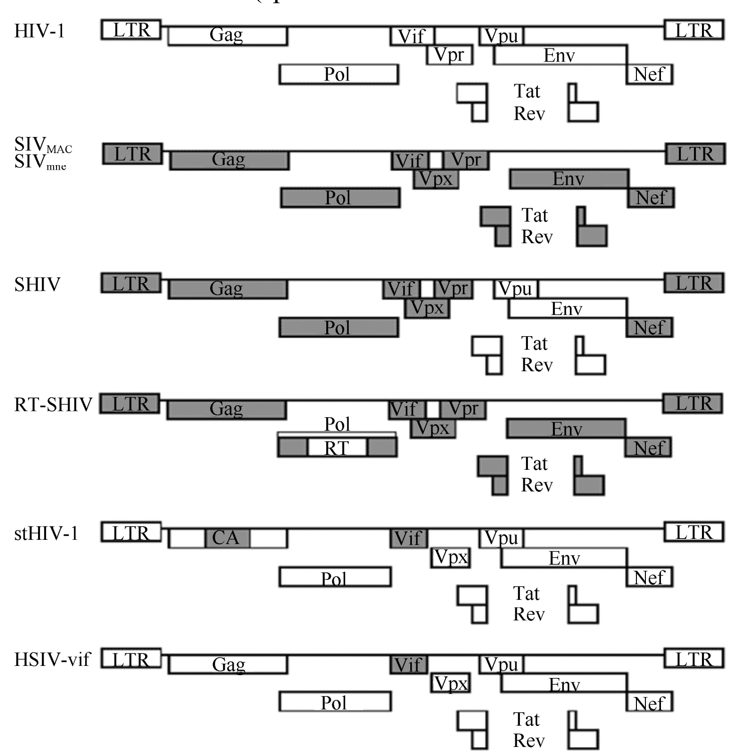


图 1　不同免疫缺陷病毒的基因结构 (经 Elsevier 许可，修改自 Ambrose et al, 2007)

Figure 1 Genome structure of various immunodeficiency viruses (Adapted from Ambrose et al, 2007 with permission from Elsevier)

早在 1988 年，科学家就发现从 SIV 感染的平顶猴淋巴结中分离出的 SIV_{mne} 能感染平顶猴，感染的平顶猴出现腹泻、贫血和消瘦等症状 (Benveniste et al, 1988)。迄今为止，研究者已利用多种 SIV 建立平顶猴感染模型。例如，SIV_{agm} 感染平顶猴能引起其 $CD4^+$ T 细胞数减少，最终出现猴 AIDS 症状 (Goldstein et al, 2005)。同时，研究发现 SIV_{smm} 的变异株 $SIV_{smmPBj14}$ 感染平顶猴后，在 10～14 d 内平顶猴会出现 $CD4^+$ T 细胞数量快速下降、腹泻和消瘦等致死性综合征 (O'Neil et al, 1999)，而 HIV-1 感染者是在感染晚期由于免疫缺陷而出现各种 AIDS 临床症状。由于 $SIV_{smmPBj14}$ 感染的平顶猴与人 AIDS 在发病时间和致病机制上不同，目前该模型研究较少。与 $SIV_{smmPBj14}$ 不同，SIV_{sun} 和 SIV_{lhoest} 静脉感染平顶猴能使平顶猴的外周血和淋巴结处 $CD4^+$ T 细胞数下降，出现鸟分枝杆菌和卡氏肺囊虫等机会性感染，但病毒载量与平顶猴的疾病进程无明显关联 (Beer et al, 2005)，与人 AIDS 情况不太一致。有些研究者发现 SIV_{mac} 感染平顶猴后，血浆中最高的病毒载量与 HIV-1 感染人的相当 (表 1)，外周血 $CD4^+$

T 细胞逐渐下降，与人感染 HIV-1 的情况很相似(Batten et al, 2006; Klatt et al, 2012a; Smith et al, 2005)。Klatt et al (2012a) 在对 SIV_{mac239}静脉感染平顶猴动态过程的研究中发现，平顶猴比猕猴的疾病进程要快，平均分别为 42.17 周和 69.56 周，其原因可能是由于平顶猴感染SIV 前的免疫活化水平高于猕猴，这与他们之前的研究结果较为一致 (Klatt et al,2010) 。而 Mason et al (2008) 发现 SIV 感染前平顶猴中心记忆 $CD4^+$ T 细胞数的多少与 SIV_{mac251} 感染平顶猴的疾病进程快慢有关，即感染前中心记忆 $CD4^+$ T 细胞数越少，感染后平顶猴的发病进程越快。此外，SIV_{mac} 感染平顶猴后疾病进程的快慢可能与平顶猴的自身免疫遗传背景有关。例如，Smith et al (2005)研究发现平顶猴中 MHC-I 类分子 *Mane-A**10 (将 SIV Gag KP9 抗原肽呈递给效应 T 细胞)和猕猴中的 *Mamu-A*01* 一样会抑制 SIV 在猴体内的复制。这些结果均说明 SIV 感染平顶猴的疾病进程可能受多方面因素影响。

表 1 HIV/AIDS 平顶猴模型的主要特征

Table 1 Main characteristics of HIV/AIDS infection in pigtailed macaques

病毒(嗜性) Virus (Tropism)	途径 Route	剂量 Dose	感染数量/总数 (Number infected)/ (Total number)	最大病毒载量 Peak viral load	调定点病毒载量 Set point viral load	$CD4^+$ T 细胞 $CD4^+$ T cells	疾病进程及症状 Disease progression and syndromes	参考文献 References
SIV_{mac239} (R5)	静脉 IV	3×10^3 $TCID_{50}$	9/9	6.28	4.67	持续下降	6 只出现艾滋症状	Klatt et al, 2012a
SIV_{mac251} (R5)	静脉 IV	40 $TCID_{50}$	8/8	6.5-8.5	4.0-7.5	持续下降	—	Smith et al, 2005
SIV_{mac251} (R5)	直肠 IR	8×10^3 $TCID_{50}$	3/3	6.5-8.5	6.0-7.0	持续下降	1 只出现艾滋症状	Kent et al, 2001
HIV-1_{LAI} (X4)	静脉 IV	10^6 $TCID_{50}$	6/6	2.92	2.58	短暂下降	—	Batten et al, 2006
HIV-1_{NL4-3} &HIV-1_{LAI} (X4)	直肠 IR	2×10^6-2×10^7 $TCID_{50}$	3/5	0-3.83	—	短暂下降	CD4/CD8 比例低	Bosch et al, 1997
HIV-2/287 (X4R5)	静脉 IV	$10\&10^5$ $TCID_{50}$	6/6	7.0-8.5	—	快速下降	很快发展至 AIDS 期	Looney et al, 1998
$SHIV_{SF162P3}$ (R5)	阴道 Ivag	6×10^3 $TCID_{50}$	8/8	6.76-8.40	<3.2-6.9	缓慢下降	3 只控制了病毒的复制	Kent et al, 2005
$SHIV_{mn229}$ (X4)	直肠 IR	2×10^2-2×10^5 $TCID_{50}$	19/19	8.09	6.13	快速下降	出现艾滋临床症状	Batten et al, 2006
$SHIV_{89.6P}$ (X4)	静脉 IV	10^2 $TCID_{50}$	2/2	6.2-6.5	3.0-5.0	急速下降	1 只猴快速发病	Pullium et al, 2001
$SHIV_{KU-1}$ (X4)	阴道 Ivag	10^3 $TCID^{50}$	2/2	—	—	急速下降	有艾滋症状并死亡	Joag et al, 1997
$HIV_{NL-DT5R}$ (X4)	静脉 IV	1.9×10^6 $TCID_{50}$	2/2	3.7-4.6	0-2.3	未下降	病毒血症持续数周，未发病	Igarash et al, 2007
stHIV-1_{sv} & stHIV-1_{2v} (R5X4)	静脉 IV	2×10^6 i.u.	4/4	5.0-6.0	1.0-4.0	轻微下降	病毒血症持续半年，未发病	Hatziioannou et al, 2009
HSIV-vif (X4)	静脉 IV	10^5 $TCID_{50}$	4/4	4.1-5.0	1.7-3.0	未下降	病毒血症持续 1.5—2 年，但未发病	Thippeshappa et al, 2011

IV：静脉; IR：直肠; Ivag：阴道; —：无相关资料；血浆病毒载量：最大病毒载量通常出现在感染后第 2—3 周；调定点病毒载量依照参考文献而定；单个值表示平均病毒载量；区间值表示病毒载量的范围。

IV : intravenously; IR: intrarectally; Ivag: intravaginally; —: no related information; plasma virus load (Log_{10} RNA copies/ml): peak viral load generally occurred 2−3 weeks following viral inoculation; set point viral load taken from references; single value denotes mean viral load; interval value denotes range of viral load.

总之，SIV 感染的平顶猴发病症状较明显，与人 AIDS 相似。SIV_{mac} 感染平顶猴模型现已被应用于 AIDS 发病机制，药物和疫苗等方面的研究。此外，有些 SIV_{mac239} 感染平顶猴的疾病进程缓慢，类似 HIV-1 感染者中的长期无进展者，可作为 HIV-1/AIDS 研究中的长期不进展模型 (Klatt et al, 2012a)。不足的是，SIV 与 HIV-1 间遗传差异较大，不能真实反应 HIV-1 蛋白在猴体内的功能。例如，SIV 不表达 HIV-1 的 Vpu 蛋白，从而限制了 *Vpu* 基因相关功能和靶标的研究。同样，SIV 表达的 Vpx 蛋白在 HIV-1 中不表达。由于序列的差异性，对 HIV-1 逆转录酶 (RT) 有抑制作用的非核苷类逆转

录酶抑制剂(NNRTIs)对 SIV_{mac} RT 无抑制作用(Uberla et al, 1995)。此外，由于囊膜蛋白及抗原表位的差异，猴体内对抗 SIV 复制的天然和获得性免疫反应(中和抗体，CTL 反应)与 HIV-1 感染人所引起的免疫反应不尽不同 (Ambrose et al, 2007)。因此，SIV 感染模型用于 AIDS 研究具有局限性。

2.2　HIV 感染平顶猴

在寻找建立 HIV/AIDS 动物模型的过程中，Agy et al (1992)首次在体外使用不同的 HIV-1 感染平顶猴、猕猴和食蟹猴等的外周血单个核细胞(PBMC)，发现仅平顶猴 PBMC 对 HIV-1 易感；用 HIV-1_{LAI} 通过静脉成功感染的 2 只平顶猴在感染后能持续检测到 HIV-1 抗体并且从分离的 PBMC 中能培养出 HIV-1_{LAI}。但是，令人遗憾的是 HIV-1 感染的平顶猴 $CD4^+$ T 细胞数基本不变，病毒载量很低且缺乏持续性，亦不表现猴 AIDS 症状 (表 1)。为使 HIV-1 在平顶猴体内持续复制，Agy et al (1997) 试图通过 HIV-1_{NL4-3} 和 HIV-1_{LAI} 在多只平顶猴体内传代以得到致病力更强的毒株，但未取得成功。Bosch et al (2000) 将 HIV-1 在新生平顶猴中传代，结果 HIV-1 发生累积突变，毒力得到提高，但是猴 $CD4^+$ T 细胞数量无变化且病毒血症仍缺乏持续性。在免疫应答方面，Kent et al (1995)研究发现 HIV-1 感染平顶猴后 4～8 周就出现了针对 HIV-1 gag、env 和 nef 蛋白的细胞毒 T 细胞效应(CTL)并持续至 140 周。同时，他们得出 HIV-1 特异的 T 淋巴细胞反应与 HIV-1 不能持续感染平顶猴有关(Kent et al, 1997)。这些研究结果说明细胞免疫对控制 HIV-1 在平顶猴中的复制发挥了重要作用。

与 HIV-1 感染平顶猴不同，HIV-2 静脉感染平顶猴后，$CD4^+$ T 细胞数明显下降且产生持续的病毒血症并出现人 AIDS 症状 (表 1)。强致病株 HIV-2_{287} 静脉感染的平顶猴 $CD4^+$ T 细胞数在 2 个月时开始下降，6～12 个月就发展到 AIDS 期 (Kuller et al, 2001)。相比之下，SIV_{sm} 感染的猕猴 $CD4^+$ T 细胞数下降通常发生在感染后 4～12 个月，发展到 AIDS 期则需要 1～3 a (Hirsch & Johnson, 1994)。HIV-1 感染者的 $CD4^+$ T 细胞数逐渐下降一般发生在感染后 7～10 a，发展到 AIDS 期通常也在感染后 7～10 a，而 HIV-2 感染者的病程很缓慢(Staprans & Feinberg, 2004)。HIV-2_{287} 对平顶猴的致病力很强，可用于 AIDS 急性致病机理的研究。此外，Pullium et al (2001)采用 HIV-2_{GB122} 分别通过静脉和直肠感染平顶猴，平顶猴精浆中出现病毒的时间要比血液中出现病毒的时间晚 1～2 周，且在病毒载量上低 10 倍。同时，与通过静脉感染的平顶猴相比，通过直肠感染的平顶猴精液中病毒的持续时间较短。这对于 HIV-1 静脉和性传播的预防研究具有重要意义。

综上所述，迄今为止，研究建立的 HIV-1 感染平顶猴是一个急性过程，病毒血症缺乏持续性，尚不能应用于 AIDS 药物和疫苗的研究。HIV-2 感染平顶猴是目前 HIV 感染旧大陆猴中唯一出现 AIDS 样症状的动物模型。由于 HIV-2 仅在西非局部地区流行，致病力较弱，因此对 HIV-2/AIDS 动物模型的研究较少。平顶猴不表达 TRIM5α 限制因子可能是其对 HIV 易感的一个重要原因 (Brennan et al, 2007; Kuang et al, 2009; Liao et al, 2007)。尽管已经发现宿主的细胞免疫对于控制病毒复制发挥重要作用，但是在 HIV-1 感染平顶猴的后期，病毒是否转为潜伏感染或是被宿主彻底清除仍有待进一步研究。

2.3　SHIV 感染平顶猴

由于 SIV 感染猕猴模型在评价艾滋病疫苗和药物的有效性方面存在较大局限性，因此，研究者采用分子克隆技术构建了以 SIV_{mac} 为骨架嵌合 HIV-1 *env*、*tat*、*rev* 和 *vpu* 基因的 SIV-HIV 嵌合病毒 Env-SHIV(Shibata et al, 1991) (图 1)。为了评价逆转录酶抑制剂的有效性，Uberla et al (1995)构建了嵌入 HIV-1 RT 的 RT-SHIV，并成功感染猕猴。近年来，研究者通过将 SHIV 病毒在猴体内多次传代培养已经得到了诸如 $SHIV_{89.6P}$ (X4 型，*env* 来自 HIV-$1_{89.6}$)、$SHIV_{KU-1}$ (X4 型，*env* 来自 HIV-1_{IIIB})和 $SHIV_{SF162P3}$ (R5 型，*env* 来自 HIV-1_{SF162})等强致病株 (Staprans & Feinberg, 2004)。SHIV 病毒可以通过静脉和黏膜两种途径感染平顶猴，感染猴出现 $CD4^+$T 细胞数下降和腹泻、消瘦等重要艾滋临床指标 (表 1)。$SHIV_{SF162P3}$ 感染猴的疾病进程较缓慢，病毒载量与 HIV-1 感染人的较为接近，因而被大量用于 HIV/AIDS 研究 (Staprans & Feinberg, 2004)。Vishwanathan et al (2011) 研究了反复低剂量 $SHIV_{SF162P3}$ 阴道途径攻毒感染平顶猴与其月经周期的关系，发现在黄体后期(孕酮水平很高且局部免疫水平较低)平顶猴对 SHIV 易感。Polacino et al (2008) 将 R5 型的 $SHIV_{SF162P4}$ 采用静脉和黏膜两种途径感染平顶猴和猕猴，发现平顶猴的病毒载量高于猕猴

且病毒血症持续时间较长，说明 SHIV 病毒对平顶猴更易感。此外，Shehu-Xhilaga et al (2007) 用 SIV_{mac251} 静脉感染和 $SHIV_{mn229}$ 直肠感染平顶猴，发现在急性感染期后，平顶猴的睾丸和附睾组织均含有 SIV 和 SHIV 病毒。这对于研究 HIV-1 性传播机制和 HIV-1 传播的预防具有重要意义。Ambrose et al (2001)则用 $SHIV_{89.6}$ 通过阴道和静脉两种途径感染平顶猴，发现通过阴道比通过静脉感染的平顶猴的前病毒载量峰值和 $CD4^+$细胞下降出现的时间要晚 1 周；在黏膜免疫应答方面，阴道途径感染的平顶猴黏膜 $CD8^+$ T 细胞反应更快、黏膜抗 SHIV 抗体水平更高，而在系统免疫应答方面无差别。这说明病毒通过阴道感染宿主时，宿主产生了更强的抗病毒免疫反应。在 RT-SHIV 感染平顶猴模型方面，Jiang et al (2009) 研究发现 RT-SHIV(RT 来自 $HIV\text{-}1_{HXB2}$)对非核苷酸逆转录酶抑制剂(NNRTIs)敏感且能够通过阴道途径感染平顶猴，可用于 NNRTIs 以及杀微生物剂和疫苗的研究。

总之，SHIV 在基因序列上比 SIV 更接近于 HIV-1，在抗体研究和以囊膜蛋白为抗原的疫苗评价中具有明显的优势 (Ambrose et al, 2007; Zhang et al, 2007)。因此，SHIV 感染平顶猴模型在 AIDS 发病机制、疫苗和杀微生物剂研究等方面得到了广泛应用(Batten et al, 2006; Kent et al, 2005; Zhu et al, 2010)。然而，SHIV 是以 SIV 为骨架所构建，在序列上与 HIV-1 存在较大差异。因此，SHIV 感染平顶猴模型在研究 AIDS 发病机制及药物和疫苗等方面仍然具有一定的局限性。最近，相关研究采用焦磷酸测序技术研究了平顶猴和正常女性阴道菌群的组成及含量，发现平顶猴的阴道菌群与正常女性的阴道菌群之间存在差异 (Spear et al, 2012)，这为阴道菌群如何影响 SIV/SHIV 通过阴道途径感染平顶猴的研究打下了基础。

2.4 HSIV 感染平顶猴

近年来，研究者采用分子生物学手段对 HIV-1 和宿主的相互作用进行了深入研究，发现了一系列抗病毒的宿主限制因子，如 TRIM5、APOBEC3 及 SAMHD1 等(图 2)(Blanco-Melo et al, 2012)。其中，

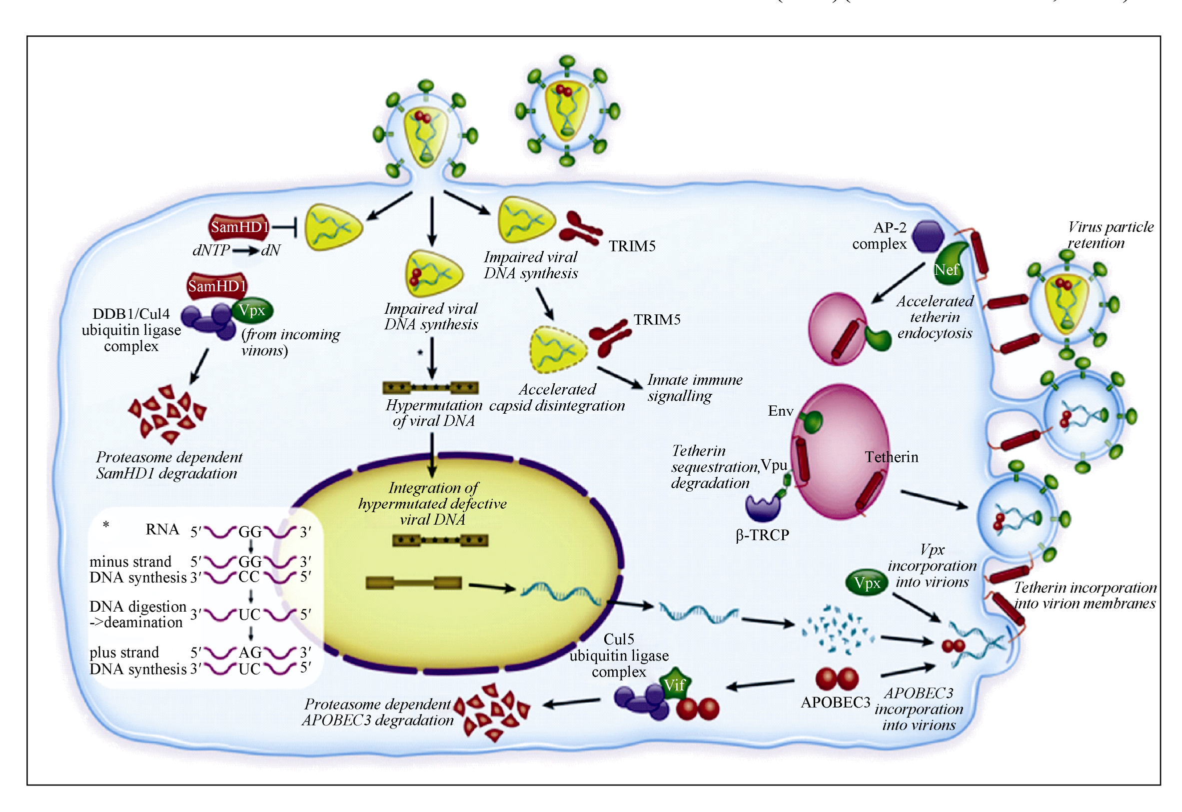


图 2 抗 HIV 和 SIV 的限制因子和拮抗它们的病毒蛋白 (经 Elsevier 许可，引自 Blanco-Melo et al, 2012)

Figure 2 Restriction factors that target HIV and SIV and their vial antagonists

(Cited from Blanco-Melo et al, 2012 with permission from Elsevier)

图中描述了限制因子作用于逆转录病毒复制周期的关键机制和拮抗它们起作用的病毒辅助蛋白。插入框中为 APOBEC3 介导的超突变过程。

Key mechanisms by which restriction factors directly act upon the retroviral replication cycle, and their counteraction by viral accessory proteins, are depicted. Process of APOBEC3-mediated hypermutation is indicated in the inset panel.

三模体蛋白 5α (tripartite motif protein 5α, TRIM5α)和载脂蛋白 B mRNA 编辑酶 3G 和 3F (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme 3G and 3F, APOBEC3G/3F)是 3 个主要的限制因子。猕猴 TRIM5α 能识别 HIV-1 并与 HIV-1 衣壳蛋白相互作用,限制 HIV-1 在猕猴细胞中的复制 (Stremlau et al, 2004)。APOBEC3G 和 APOBEC3F 为胞嘧啶脱氨酶,在病毒逆转录时可以将其 cDNA 的胞嘧啶(C)脱氨为尿嘧啶(U), 使前病毒发生超突变，抑制病毒的复制作用,而这一作用可被病毒的辅助蛋白 Vif (virion infectivity factor)所拮抗且拮抗作用具有物种特异性(species-specificity)。HIV-1 的 Vif 蛋白能够拮抗人的 APOBEC3G/F,而不能拮抗猴的 APOBEC3G/F (Chiu & Greene, 2008)。研究发现，APOBEC3H 也能限制 HIV-1 的复制 (Albin & Harris, 2010)。在一些 HIV-1 感染者中，APOBEC3 mRNA 的表达水平和 HIV-1 病毒载量或病毒发生超突变的百分比呈负相关，而与 $CD4^+$T 细胞数正相关 (Albin & Harris, 2010)。例如，Ulenga et al (2008)发现在 APOBEC3G 和 APOBEC3F mRNA 水平上，低调定点病毒载量的 HIV-1 感染者比高调定点病毒载量的感染者的表达量明显要高。同时，Mussil et al (2011)发现 SIV 感染的猕猴中，病毒载量较低或长期不进展的猕猴体内 APOBEC3G 和 APOBEC3F mRNA 表达量明显升高。最近，Endsley & Ho (2012)发现 $HIV\text{-}2_{287}$感染平顶猴后，APOBEC3G-CD4、Vif-CD4 及 APOBEC3G-Vif 间存在较强的相关性。

基于拮抗猕猴 TRIM5α 和 APOBEC3 蛋白限制病毒复制的作用及缩小 SIV/SHIV 与 HIV-1 之间的遗传差异的双重考虑，Hatziioannou et al (2006)以 HIV-1 为骨架将其表达衣壳蛋白(CA)的基因和 *vif* 基因替换成 SIV_{mac} 的相应基因构建了 stHIV-1 (simian-tropic HIV-1) (图 1)。他们发现 stHIV-1 在体外多次传代后能在猕猴外周血淋巴细胞(PBL)中复制。Kamada et al (2006)则将 $HIV\text{-}1_{NL4\text{-}3}$ 的 *CA* 基因的一小段 (HIV-1 cyclophilin A 结合位点)和 *vif* 基因替换成 SIV_{mac} 的相应基因并经体外传代后得到 $HIV_{NL\text{-}DT5R}$。他们的体外结果显示平顶猴 T 淋巴细胞比猕猴 T 淋巴细胞对 $HIV_{NL\text{-}DT5R}$ 更易感。平顶猴感染 $HIV_{NL\text{-}DT5R}$ 后能产生针对 HIV-1 蛋白的抗体，但平顶猴感染后的 $CD4^+$ T 细胞数没有下降，没有出现 AIDS 病症 (Igarash et al, 2007) (表 1)。此外，Kuroishi et al (2009)在 $HIV_{NL\text{-}DT5R}$ 的基础上将 HIV-1 衣壳蛋白的 α 螺旋 6 和 7 之间的环序列替换成 SIV_{mac} L6/7 CA 的序列提高了其在食蟹猴细胞上的复制能力。随后，Saito et al (2011)采用基因工程方法构建了 HIV-1(MN4-5S)，发现其在食蟹猴体内、外的复制能力强于 $HIV_{NL\text{-}DT5R}$ 的复制能力，与 $HIV_{NL\text{-}DT5R}$ 感染平顶猴的能力相当 (Igarashi et al, 2007)，而 MN4-5S 和 $HIV_{NL\text{-}DT5R}$ 均不能在猕猴细胞中复制。随后，他们对 stHIV-1 的 Gag-CA 的序列区进行改造得到了一系列的 HIV-1mt (macaque-tropic HIV-1), 体外实验发现病毒 MN4Rh-3 (Gag-CA 发生 Q110D 突变)在食蟹猴细胞中的复制能力得到提高但与 TRIM5α 蛋白的抗病毒作用无关，这说明猴体内可能还存在其他蛋白与 Gag-CA 蛋白相互作用影响病毒的复制水平(Nomaguchi et al，2013)。上述研究结果表明 stHIV-1 病毒对宿主的易感性受猴的免疫遗传背景影响，stHIV-1 对不同猴的易感性排序为：平顶猴>食蟹猴>猕猴。

由于平顶猴细胞不表达限制 HIV-1 复制的 TRIM5α 蛋白，研究人员以 HIV-1 为骨架仅将 HIV-1 的 *vif* 基因替换成 SIV 的 *vif* 基因构建了 HSIV-vif 毒株 (Hatziioannou et al, 2009; Thippeshappa et al, 2011) (图 1)。Hatziioannou et al (2009) 在 $HIV\text{-}1_{NL4\text{-}3}$ 的基础上构建了 $stHIV\text{-}1_{SV}$ (*vif* 来自 SIV_{mac239}，*env* 来自 SHIV-KB9)、$stHIV\text{-}1_{2V}$(*vif* 来自 $HIV\text{-}2_{ROD}$，*env* 来自 SHIV-KB9)和 $stHIV\text{-}1_{SCA+SV}$ (在 $stHIV\text{-}1_{SV}$ 基础上将 CA 的序列替换成 SIV_{mac239} 的 CA 序列)，且它们在平顶猴细胞中均能很好地复制(图 3)。同时，他

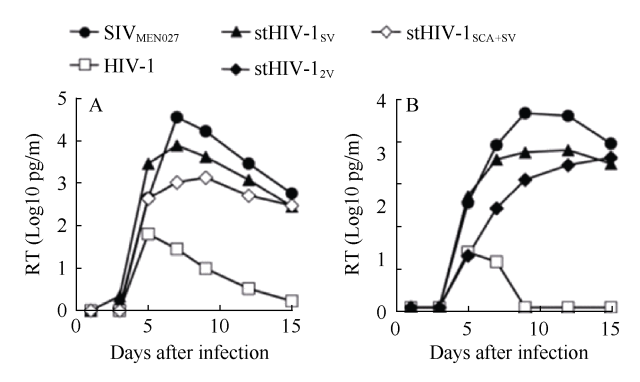


图 3 stHIV-1 在平顶猴淋巴细胞上的复制 (引自 Hatziioannou et al, 2009)

Figure 3 Replication of stHIV-1 variants in pigtailed macaque lymphocytes *in vitro* (cited from Hatziioannou et al, 2009)

A) 和 B)表示 2 个不同平顶猴淋巴细胞感染病毒的结果。每隔 2～3 d 检测培养上清中 RT 活性。

A) and B) represent independent experiments employing two different pigtailed macaque donors. RT activity in culture supernatants was measured every two or three days.

们将 stHIV-1_{SV} 和 stHIV-1_{2V} 混合感染平顶猴后发现感染急性期的病毒载量水平与 HIV-1 感染者急性期的病毒载量水平相当，且在感染后 0.5 a 内均能在猴体内检测到病毒血症 (表 1)，而随后由于 $CD8^+T$ 细胞或其他免疫细胞和分子的抗病毒作用，病毒在平顶猴体内的复制受到了抑制。同时，采用鸡尾酒疗法对平顶猴进行感染前预防用药(pre-exposure prophylaxis, PrEP)，发现 PrEP 可有效预防高剂量的 stHIV-$1_{sv/2v}$ 静脉感染平顶猴。与之类似的是，Thippeshappa et al (2011) 在 HIV-$1_{NL4\text{-}3}$ 的基础上只将 *vif* 替换成 SIV_{mne027} 的 *vif* 得到 HSIV-vif, 通过静脉感染平顶猴后，也出现持续的病毒血症 (>1.5～2 a)和针对 HIV-1 的特异抗体反应。Humes & Overbaugh (2011)在 R5 嗜性 A 亚型的 $HIVA_{Q23}$ 的基础上将其 *vif* 基因替换为 SIV_{mac239} 的 *vif* 构建了 $HIVA_{Q23}/SIV_{vif}$ 病毒。$HIVA_{Q23}/SIV_{vif}$ 在平顶猴淋巴细胞中的复制能力较弱，但在体外传代过程中 gp120 处发生了 2 个独立的突变: G312V(V3 环)和 A204E(C2 区)。这 2 个突变显著提高了病毒 gp120 与平顶猴细胞 CD4 分子的相互作用，使得病毒复制水平明显上升。这为提高含 HIV-1A 亚型基因的 HSIV 病毒在平顶猴细胞中的复制水平提供了有用线索。

创建接近于人 AIDS 的动物模型一直是 AIDS 非人灵长类动物模型研究的方向，而 HIV/AIDS 动物模型能否用于 HIV-1 方面的研究取决于所用病毒与 HIV-1 在病毒传播、致病性和变异性等方面的相似程度。与 SHIV(含 28%～30%的 HIV-1 序列)不同，stHIV-1 或 HSIV-vif 涵盖了≥90%的 HIV-1 序列，为针对 HIV-1 的药物、疫苗和杀微生物剂的研究提供了很好的平台。建立类似人 AIDS 症状的 stHIV-1 或 HSIV 感染平顶猴模型将是未来 AIDS 研究领域中的一个重要方向。目前，HSIV-vif 感染平顶猴模型解决了 HIV-1 不能持续感染平顶猴的问题，但是感染后的平顶猴 $CD4^+$ T 细胞数没有明显变化，平顶猴不出现艾滋病症。另外，当前大部分流行 HIV-1 病毒是 CCR5 嗜性的(Staprans & Feinberg, 2004)，因此构建 R5 型的 HSIV-vif 感染平顶猴模型具有重要的现实意义。Thippeshappa et al (2011) 的体外实验结果表明 R5 型的 HSIV-vif 与 X4 型的 HSIV-vif 在平顶猴 PBMC 中的复制水平相当。然而，HSIV-vif 是否能通过黏膜途径感染平顶猴，R5 型的 HSIV-vif 是否能持续感染平顶猴等的问题有待进一步研究。2011 年，研究者在髓系来源的单核细胞中发现了抗HIV-1 限制因子 SAMHD1(sterile alpha motif and histidine/aspartic acid domain-containing protein 1)，其在活化的 $CD4^+T$ 细胞中不表达，而在表达 CCR5 受体的静息 $CD4^+T$ 细胞、巨噬细胞以及树突状细胞中均有所表达 (Baldauf et al, 2012; Li PL et al, 2012)。SAMHD1 是一种 dGTP 激活的三磷酸水解酶，通过降解 HIV-1 逆转录所需的 dNTPs 来抑制病毒的复制，且可被 HIV-2 和 SIV 编码的 Vpx 蛋白所拮抗(Blanco-Melo et al, 2012)。Vpx 蛋白在 SIV 有效感染平顶猴中发挥重要作用 (Belshan et al, 2012)。猴和人的 SAMHD1 均能有效抑制 HIV-1 的复制水平。因此，R5 型的 stHIV-1 或 HSIV 病毒在平顶猴体内的复制会受到 SAMHD1 的抑制。由此可见，为使 HSIV-vif 感染的平顶猴发病进程与人 AIDS 相似，我们有必要对 stHIV-1 或 HSIV-vif 病毒在猴体内进行传代或进一步改造，如嵌入 SIV 的 *vpx* 基因、替换 HIV-1 的其他基因序列或对病毒质粒进行定点突变。

3 展 望

在过去的 30 a 中，HIV/AIDS 灵长类动物模型在 HIV-1 的传播和致病机制、临床前 AIDS 疫苗的研发、药物和杀微生物剂等的研究方面发挥了举足轻重的作用。HAART 治疗能控制 HIV-1 复制，但是不能清除病毒潜伏库。我们或许能在非人灵长类动物模型上找到根治 HIV-1 的方法或策略。但是病毒感染物种的特异性给构建合适的 AIDS 动物模型带来了极大的挑战，缺少对 HIV-1 易感的动物模型仍然是制约人类对抗 HIV/AIDS 的一大瓶颈。在旧大陆猴中，平顶猴与猕猴和食蟹猴不同，能急性感染 HIV-1 且对某些 SIV/SHIV 更易感。尽管 HSIV 感染平顶猴后未出现艾滋症状，但 HSIV 能持续感染平顶猴，有望成为更合适的 HIV/AIDS 静脉和性传播动物模型。

近年来，平顶猴数量的不足及其遗传背景资料的缺乏严重限制了其在病毒免疫学方面的研究和应用。灵长类动物的某些 MHC 会影响病毒的免疫逃逸，某些 MHC 的等位基因能够显著延缓 AIDS 疾病的进展 (Baroncelli et al, 2008; Dai et al, 2008)。因此，系统研究平顶猴 MHC 的遗传背景对于深入理解 SIV/HIV 感染平顶猴的致病机理及疫苗研究具有重要意义。中国科学院昆明动物研究所规模引进了北平顶猴 (*M. leonina*)并进行饲养繁育和种群扩

大，将为我国科技自主创新、疾病防控和人类健康提供强有力的支撑。我们实验室已经建立了SIV/SHIV感染中国猕猴的AIDS动物模型并进行了相关机制研究 (Li et al, 2007b; Li SY et al, 2012; Ma et al, 2012; Xia et al, 2010; 2011)，积累了较丰富的经验。我们还对北平顶猴的血液学和血液生化学指标参数进行了测定，为北平顶猴动物模型创建提供了重要的基础生物学数据(Pang et al, 2013)。目前正在开展新型 HIV/HSIV 感染北平顶猴方面的工作，旨在进一步研究感染北平顶猴的特性及机制，为 HIV/AIDS 发病机制、药物和疫苗研究提供更好的研究平台。

参考文献：

Agy MB, Frumkin LR, Corey L, Coombs RW, Wolinsky SM, Koehler J, Morton WR, Katze MG. 1992. Infection of Macaca nemestrina by human immunodeficiency virus type-1. *Science,* **257**(5066): 103-106.

Agy MB, Schmidt A, Florey MJ, Kennedy BJ, Schaefer G, Katze MG, Corey L, Morton WR, Bosch ML. 1997. Serial *in vivo* passage of HIV-1 infection in *Macaca nemestrina*. *Virology,* **238**(2): 336-343.

Albin JS, Harris RS. 2010. Interactions of host APOBEC3 restriction factors with HIV-1 in vivo: implications for therapeutics. *Expert Reviews in Molecular Medicine,* **12**: e4.

Ambrose Z, KewalRamani VN, Bieniasz PD, Hatziioannou T. 2007. HIV/AIDS: in search of an animal model. *Trends in Biotechnology,* **25**(8): 333-337.

Ambrose Z, Larsen K, Thompson J, Stevens Y, Finn E, Hu SL, Bosch ML. 2001. Evidence for early local viral replication and local production of antiviral immunity upon mucosal simian-human immunodeficiency virus $SHIV_{89.6}$ infection in *Macaca nemestrina*. *Journal of Virology,* **75**(18): 8589-8596.

Baldauf HM, Pan XY, Erikson E, Schmidt S, Daddacha W, Burggraf M, Schenkova K, Ambiel I, Wabnitz G, Gramberg T, Panitz S, Flory E, Landau NR, Sertel S, Rutsch F, Lasitschka F, Kim B, Konig R, Fackler OT, Keppler OT. 2012. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting $CD4^+$ T cells. *Nature Medicine,* **18**(11): 1682-1689.

Baroncelli S, Negri DR, Michelini Z, Cara A. 2008. *Macaca mulatta, fascicularis* and *nemestrina* in AIDS vaccine development. *Expert Review of Vaccines,* **7**(9): 1419-1434.

Batten CJ, De Rose R, Wilson KM, Agy MB, Chea S, Stratov I, Montefiori DC, Kent SJ. 2006. Comparative evaluation of simian, simian-human, and human immunodeficiency virus infections in the pigtail macaque (*Macaca nemestrina*) model. *AIDS Research and Human Retroviruses,* **22**(6): 580-588.

Beer BE, Brown CR, Whitted S, Goldstein S, Goeken R, Plishka R, Buckler-White A, Hirsch VM. 2005. Immunodeficiency in the absence of high viral load in pig-tailed macaques infected with Simian immunodeficiency virus SIVsun or SIVlhoest. *Journal of Virology,* **79**(22): 14044-14056.

Belshan M, Kimata JT, Brown C, Cheng XG, McCulley A, Larsen A, Thippeshappa R, Hodara V, Giavedoni L, Hirsch V, Ratner L. 2012. Vpx is critical for SIVmne infection of pigtail macaques. *Retrovirology,* **9**(1): 32.

Benveniste RE, Morton WR, Clark EA, Tsai CC, Ochs HD, Ward JM, Kuller L, Knott WB, Hill RW, Gale MJ. 1988. Inoculation of baboons and macaques with simian immunodeficiency virus/Mne, a primate lentivirus closely related to human immunodeficiency virus type 2. *Journal of Virology,* **62**(6): 2091-2101.

Blanco-Melo D, Venkatesh S, Bieniasz PD. 2012. Intrinsic cellular defenses against human immunodeficiency viruses. *Immunity,* **37**(3): 399-411.

Bosch ML, Schmidt A, Agy MB, Kimball LE, Morton WR. 1997. Infection of Macaca nemestrina neonates with HIV-1 via different routes of inoculation. *AIDS,* **11**(13): 1555-1563.

Bosch ML, Schmidt A, Chen JL, Florey MJ, Agy M, Morton WR. 2000. Enhanced replication of HIV-1 in vivo in pigtailed macaques (*Macaca nemestrina*). *Journal of Medical Primatology,* **29**(3-4): 107-113.

Brennan G, Kozyrev Y, Kodama T, Hu SL. 2007. Novel TRIM5 isoforms expressed by *Macaca nemestrina*. *Journal of Virology,* **81**(22): 12210-12217.

Cao G, Liu FL, Zhang GH, Zheng YT. 2012. The primate *TRIMCyp* fusion genes and mechanism of restricting retroviruses replication. *Zoological Research,* **33**(1): 99-107 [曹光, 刘丰亮, 张高红, 郑永唐. 2012. 灵长类动物中 *TRIMCyp* 融合基因模式及对逆转录病毒复制的限制作用. 动物学研究, **33**(1): 99-107]

Chiu YL, Greene WC. 2008. The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annual Review of Immunology,* **26**(1): 317-353.

Couedel-Courteille A, Pretet JL, Barget N, Jacques S, Petitprez K, Tulliez M, Guillet JG, Venet A, Butor C. 2003. Delayed viral replication and $CD4^+$ T cell depletion in the rectosigmoid mucosa of macaques during primary rectal SIV infection. *Virology,* **316**(2): 290-301.

Dai ZX, Zhang GH, Zheng YT. 2008. Advances in research of rhesus macaque MHC and its significance in animal models of AIDS. *International Journal of Immunology,* **31**(5): 334-339. [戴正喜, 张高红, 郑永唐. 2008. 猕猴 MHC 研究及在 AIDS 动物模型中的意义. 国际免疫学杂志, **31**(5): 334-339.]

Endsley AN, Ho RJ. 2012. Elucidation of the time course of adenosine deaminase *APOBEC3G* and viral infectivity factor *vif* in $HIV\text{-}2_{287}$-infected infant macaques. *Journal of Medical Primatology,* **41**(1): 52-59.

Gippoliti S. 2001. Notes on the taxonomy of *Macaca nemestrina leonina* blyth, 1863 (Primates: Cercopithecidae). *Hystrix-Italian Journal of Mammalogy,* **12**(1): 51-54.

Goldstein S, Ourmanov I, Brown CR, Plishka R, Buckler-White A, Byrum R, Hirsch VM. 2005. Plateau levels of viremia correlate with the degree of $CD4^+$-T-cell loss in simian immunodeficiency virus SIVagm-infected pigtailed macaques: variable pathogenicity of natural SIVagm isolates. *Journal of Virology,* **79**(8): 5153-5162.

Groves CP. 2001. Primate Taxonomy. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 222-224.

Hatziioannou T, Evans DT. 2012. Animal models for HIV/AIDS research. *Nature Reviews Microbiology,* **10**(12): 852-867.

Hatziioannou T, Princiotta M, Piatak M, Yuan F, Zhang FW, Lifson JD, Bieniasz PD. 2006. Generation of simian-tropic HIV-1 by restriction factor evasion. *Science,* **314**(5796): 95.

Hatziioannou T, Ambrose Z, Chung NPY, Piatak M, Yuan F, Trubey CM, Coalter V, Kiser R, Schneider D, Smedley J, Pung R, Gathuka M, Estes JD, Veazey RS, KewalRamani VN, Lifson JD, Bieniasz PD. 2009. A macaque model of HIV-1 infection. *Proceedings of the Natlonal Academy of Sciences United States of America,* **106**(11): 4425-4429.

Henning T, Fakile Y, Phillips C, Sweeney E, Mitchell J, Patton D, Sturdevant G, Caldwell HD, Secor WE, Papp J, Hendry RM, McNicholl J, Kersh E. 2011. Development of a pigtail macaque model of sexually transmitted infection/HIV coinfection using *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, and $SHIV_{SF162P3}$. *Journal of Medical Primatology,* **40**(4): 214-223.

Hirsch VM, Johnson PR. 1994. Pathogenic diversity of simian immunodeficiency viruses. *Virus Research,* **32**(2): 183-203.

Hu SL. 2005. Non-human primate models for AIDS vaccine research. *Current Drug Targets Infectious Disorders,* **5**(2): 193-201.

Humes D, Overbaugh J. 2011. Adaptation of subtype a human immunodeficiency virus type 1 envelope to pig-tailed macaque cells. *Journal of Virology,* **85**(9): 4409-4420.

Igarashi T, Iyengar R, Byrum RA, Buckler-White A, Dewar RL, Buckler CE, Lane HC, Kamada K, Adachi A, Martin MA. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 derivative with 7% simian immunodeficiency virus genetic content is able to establish infections in pig-tailed macaques. *Journal of Virology,* **81**(20): 11549-11552.

Jiang YH, Tian BP, Saifuddin M, Agy MB, Emau P, Cairns JS, Tsai CC. 2009. RT-SHIV, an infectious CCR5-tropic chimeric virus suitable for evaluating HIV reverse transcriptase inhibitors in macaque models. *AIDS Research and Therapy,* **6**(1): 23.

Joag SV, Li Z, Foresman L, Pinson DM, Raghavan R, Zhuge W, Adany I, Wang C, Jia F, Sheffer D, Ranchalis J, Watson A, Narayan O. 1997. Characterization of the pathogenic KU-SHIV model of acquired immunodeficiency syndrome in macaques. *AIDS Research and Human Retroviruses,* **13**(8): 635-645.

Kamada K, Igarashi T, Martin MA, Khamsri B, Hatcho K, Yamashita T, Fujita M, Uchiyama T, Adachi A. 2006. Generation of HIV-1 derivatives that productively infect macaque monkey lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **103**(45): 16959-16964.

Kent SJ, Woodward A, Zhao A. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T cell responses correlate with control of acute HIV-1 infection in macaques. *The Journal of Infectious Diseases,* **176**(5): 1188-1197.

Kent SJ, Corey L, Agy MB, Morton WR, McElrath MJ, Greenberg PD. 1995. Cytotoxic and proliferative T cell responses in HIV-1-infected *Macaca nemestrina*. *Journal of Clinical Investigation,* **95**(1): 248-256.

Kent SJ, Dale CJ, Preiss S, Mills J, Campagna D, Purcell DF. 2001. Vaccination with attenuated simian immunodeficiency virus by DNA inoculation. *Journal of Virology,* **75**(23): 11930-11934.

Kent SJ, Dale CJ, Ranasinghe C, Stratov I, De Rose R, Chea S, Montefiori DC, Thomson S, Ramshaw IA, Coupar BE, Boyle DB, Law M, Wilson KM, Ramsay AJ. 2005. Mucosally-administered human-simian immunodeficiency virus DNA and fowlpoxvirus-based recombinant vaccines reduce acute phase viral replication in macaques following vaginal challenge with CCR5-tropic $SHIV_{SF162P3}$. *Vaccine,* **23**(42): 5009-5021.

Klatt NR, Silvestri G, Hirsch V. 2012b. Nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine,* **2**(1): a007153.

Klatt NR, Canary LA, Vanderford TH, Vinton CL, Engram JC, Dunham RM, Cronise HE, Swerczek JM, Lafont BA, Picker LJ, Silvestri G, Brenchley JM. 2012a. Dynamics of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection in pigtail macaques. *Journal of Virology,* **86**(2): 1203-1213.

Klatt NR, Harris LD, Vinton CL, Sung H, Briant JA, Tabb B, Morcock D, McGinty JW, Lifson JD, Lafont BA, Martin MA, Levine AD, Estes JD, Brenchley JM. 2010. Compromised gastrointestinal integrity in pigtail macaques is associated with increased microbial translocation, immune activation, and IL-17 production in the absence of SIV infection. *Mucosal Immunology,* **3**(4): 387-398.

Kuang YQ, Tang X, Liu FL, Jiang XL, Zhang YP, Gao GX, Zheng YT. 2009. Genotyping of TRIM5 locus in northern pig-tailed macaques (*Macaca leonina*), a primate species susceptible to Human Immunodeficiency Virus type 1 infection. *Retrovirology,* **6**(1): 58.

Kuller L, Schmidt A, Mack H, Durning M, Birkebak T, Reiner MT, Anderson DM, Morton WR, Agy MB. 2001. Systemic and intestinal immune responses to $HIV\text{-}2_{287}$ infection in *Macaca nemestrina*. *AIDS Research and Human Retroviruses,* **17**(12): 1191-1204.

Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Nakayama EE. 2009. Modification of a loop sequence between alpha-helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology,* **6**(1): 70.

Lackner AA, Veazey RS. 2007. Current concepts in AIDS pathogenesis: insights from the SIV/macaque model. *Annual Review of Medicine,* **58**(1): 461-476.

Laurén A, Vödrös D, Thorstensson R, Fenyö EM. 2006. Comparative studies on mucosal and intravenous transmission of simian immunodeficiency virus (SIVsm): evolution of coreceptor use varies with

pathogenic outcome. *Journal of General Virology,* **87**(Pt 3): 581-594.

Li MH, Zhang GH, Sun T, Zheng YT. 2007a. The value of nonhuman primate animal models in anti-HIV drug studies. *Chinese Journal of New Drugs,* **16**(16): 1237-1242. [李明华, 张高红, 孙涛, 郑永唐. 2007a. 灵长类动物模型在抗 HIV 药物研究中的应用. 中国新药杂志，**16**(16): 1237-1242.]

Li MH, Li SY, Xia HJ, Wang L, Wang YY, Zhang GH, Zheng YT. 2007b. Establishment of AIDS animal model with SIVmac239 infected Chinese rhesus monkey. *Virologica Sinica,* **22**(6): 509-516.

Li PL, Chen QQ, Zhang CY. 2012. SAMHD1—A HIV-1 restriction factor derived from Myeloid lineage monocytes. *Zoological Research,* **33**(5): 537-541. [李佩璐, 陈倩倩, 张弛宇. 2012a. 髓系单核细胞来源的 HIV-1 限制因子—SAMHD1. 动物学研究, **33**(5): 537-541.]

Li SY, Xia HJ, Dai ZX, Zhang GH, Fan B, Li MH, Wang RR, Zheng YT. 2012. Dynamics and functions of $CD4^{+}CD25^{high}$ regulatory T lymphocytes in Chinese rhesus macaques during the early stage of infection with SIVmac239. *Archives of Virology,* **157**(5): 961-967.

Liao CH, Kuang YQ, Liu HL, Zheng YT, Su B. 2007. A novel fusion gene, TRIM5-Cyclophilin A in the pig-tailed macaque determines its susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS*, **21**(Suppl 8): S19-S26.

Looney DJ, McClure J, Kent SJ, Radaelli A, Kraus G, Schmidt A, Steffy K, Greenberg P, Hu SL, Morton WR, Wong-Staal F. 1998. A minimally replicative HIV-2 live-virus vaccine protects *M. nemestrina* from disease after HIV-2(287) challenge. *Virology,* **242**(1): 150-160.

Ma JP, Xia HJ, Zhang GH, Han JB, Zhang LG, Zheng YT. 2012. Inhibitory effects of chloroquine on the activation of plasmacytoid dendritic cells in SIVmac239 infected Chinese rhesus macaques. *Cellular and Molecular Immunology,* **9**(5): 410-416.

Mason RD, de Rose R, Seddiki N, Kelleher AD, Kent SJ. 2008. Low pre-infection levels and loss of central memory $CD4^{+}$ T cells may predict rapid progression in SIV-infected pigtail macaques. *Virology,* **381**(1): 11-15.

Morales JC, Melnick DJ. 1998. Phylogenetic relationships of the macaques (Cercopithecidae: *Macaca*), as revealed by high resolution restriction site mapping of mitochondrial ribosomal genes. *Journal of Human Evoloution,* **34**(1): 1-23.

Mussil B, Sauermann U, Motzkus D, Stahl-Hennig C, Sopper S. 2011. Increased APOBEC3G and APOBEC3F expression is associated with low viral load and prolonged survival in simian immunodeficiency virus infected rhesus monkeys. *Retrovirology,* **8**(1): 77.

Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A. 2013. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and Infection,* **15**(1): 56-65.

O'Neil SP, Mossman SP, Maul DH, Hoover EA. 1999. Virus threshold determines disease in SIVsmmPBj14-infected macaques. *AIDS Research and Human Retroviruses,* **15**(2): 183-194.

Pang W, Lv LB, Wang Y, Li C, Huang DT, Lei AH, Zhang GH, Zheng YT. 2013, Measurement and analysis of hematology and blood chemistry parameters in northern pigtailed macaques (*Macaca leonina*). *Zoological Research,* **34**(2): 89-96. [庞伟，吕龙宝，王芸，李贵，黄东体，雷爱华，张高红，郑永唐. 北平顶猴 (*Macaca leonina*) 血液学和血液生化指标参考值的测定与分析. 动物学研究, 2013, 34(2): 89-96.]

Patton DL, Sweeney YT, Paul KJ. 2009. A summary of preclinical topical microbicide rectal safety and efficacy evaluations in a pigtailed macaque model. *Sexually Transmitted Diseases*, **36**(6): 350-356.

Patton DL, Cosgrove-Sweeney YT, Rabe LK, Hillier SL. 2001. The pig-tailed macaque rectal model: microflora and chlamydial infection. *Sexually Transmitted Diseases,* **28**(7): 363-366.

Patton DL, Sweeney YC, Tsai CC, Hillier SL. 2004. Macaca fascicularis vs. Macaca nemestrina as a model for topical microbicide safety studies. *Journal of Medical Primatology,* **33**(2): 105-108.

Patton DL, Sweeney YT, Agnew KJ, Balkus JE, Rabe LK, Hillier SL. 2006. Development of a nonhuman primate model for Trichomonas vaginalis infection. *Sexually Transmitted Diseases,* **33**(12): 743-746.

Polacino P, Larsen K, Galmin L, Suschak J, Kraft Z, Stamatatos L, Anderson D, Barnett SW, Pal R, Bost K, Bandivdekar AH, Miller CJ, Hu SL. 2008. Differential pathogenicity of SHIV infection in pig-tailed and rhesus macaques. *Journal of Medical Primatology,* **37**(Suppl 2): 13-23.

Pullium JK, Adams DR, Jackson E, Kim CN, Smith DK, Janssen R, Gould K, Folks TM, Butera S, Otten RA. 2001. Pig-tailed macaques infected with human immunodeficiency virus (HIV) type 2GB122 or simian/HIV89. 6p express virus in semen during primary infection: new model for genital tract shedding and transmission. *Journal of Infectious Diseases,* **183**(7): 1023-1030.

Rosenblum LL, Supriatna J, Melnick DJ. 1997. Phylogeographic analysis of pigtail macaque populations (Macaca nemestrina) inferred from mitochondrial DNA. *American Journal of Physical Anthropology,* **104**(1): 35-45.

Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee YJ, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H. 2011. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection,* **13**(1): 58-64.

Shehu-Xhilaga M, Kent S, Batten J, Ellis S, Van der Meulen J, O'Bryan M, Cameron PU, Lewin SR, Hedger MP. 2007. The testis and epididymis are productively infected by SIV and SHIV in juvenile macaques during the post-acute stage of infection. *Retrovirology,* **4**(1): 7.

Shibata R, Kawamura M, Sakai H, Hayami M, Ishimoto A, Adachi A. 1991. Generation of a chimeric human and simian immunodeficiency virus infectious to monkey peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Virology,* **65**(7): 3514-3520.

Smith MZ, Dale CJ, de Rose R, Stratov I, Fernandez CS, Brooks AG, Weinfurter J, Krebs K, Riek C, Watkins DI, O'Connor DH, Kent SJ. 2005. Analysis of pigtail macaque major histocompatibility complex class I molecules presenting immunodominant simian immunodeficiency virus epitopes. *Journal of Virology,* **79**(2): 684-695.

Spear GT, Kersh E, Guenthner P, Vishwanathan SA, Gilbert D, Zariffard MR, Mirmonsef P, Landay A, Zheng L, Gillevet P. 2012. Longitudinal assessment of pigtailed macaque lower genital tract microbiota by pyrosequencing reveals dissimilarity to the genital microbiota of healthy humans. *AIDS Research and Human Retroviruses,* **28**(10): 1244-1249.

Staprans SI, Feinberg MB. 2004. The roles of nonhuman primates in the preclinical evaluation of candidate AIDS vaccines. *Expert Review of Vaccines,* **3**(4 Suppl): S5-S32.

Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5 alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature,* **427**(6977): 848-853.

Thippeshappa R, Polacino P, Yu Kimata MT, Siwak EB, Anderson D, Wang W, Sherwood L, Arora R, Wen M, Zhou P, Hu SL, Kimata JT. 2011. Vif substitution enables persistent infection of pig-tailed macaques by human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology,* **85**(8): 3767-3779.

Uberla K, Stahl-Hennig C, Bottiger D, Matz-Rensing K, Kaup FJ, Li J, Haseltine WA, Fleckenstein B, Hunsmann G, Oberg B. 1995. Animal model for the therapy of acquired immunodeficiency syndrome with reverse transcriptase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **92**(18): 8210-8214.

Ulenga NK, Sarr AD, Thakore-Meloni S, Sankale JL, Eisen G, Kanki PJ. 2008. Relationship between human immunodeficiency type 1 infection and expression of human APOBEC3G and APOBEC3F. *The Journal of Infectious Diseases,* **198**(4): 486-492.

Van Rompay KK. 2012. The use of nonhuman primate models of HIV infection for the evaluation of antiviral strategies. *AIDS Research and Human Retroviruses,* **28**(1): 16-35.

Vishwanathan SA, Guenthner PC, Lin CY, Dobard C, Sharma S, Adams DR, Otten RA, Heneine W, Hendry RM, McNicholl JM, Kersh EN. 2011. High susceptibility to repeated, low-dose, vaginal SHIV exposure late in the luteal phase of the menstrual cycle of pigtail macaques. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes,* **57**(4): 261-264.

Xia HJ, Ma JP, Zhang GH, Han JB, Wang JH, Zheng YT. 2011. Effect of plasma viremia on apoptosis and immunophenotype of dendritic cells subsets in acute SIVmac239 infection of Chinese rhesus macaques. *PLoS One,* **6**(12): e29036.

Xia HJ, Zhang GH, Ma JP, Dai ZX, Li SY, Han JB, Zheng YT. 2010. Dendritic cell subsets dynamics and cytokine productions in SIVmac239 infected Chinese rhesus macaques. *Retrovirology,* **7**(1): 102.

Zhang GH, Li MH, Zheng YT. 2007. Application of AIDS macaques animal model in HIV vaccine research. *Zoological Research,* **28**(5): 556-562. [张高红, 李明华, 郑永唐. 2007. AIDS 猕猴模型在 HIV 疫苗研究中的应用. 动物学研究, **28**(5): 556-562.]

Zhou DY, Zhang X, Li WH, Xu XN, Goonetilleke N, Yang HB, Dong T, Yan HP. 2013. Broader T cell responses directed against human immunodeficiency virus type 1 in infected Chinese individuals through blood-borne transmission in comparison with mucosal transmission. *AIDS Research and Human Retroviruses,* **29**(1): 89-93.

Zhu L, Zhang GH, Zheng YT. 2010. Application studies of animal models in evaluating safety and efficacy of HIV-1 microbicides. *Zoological Research,* **31**(1): 66-76. [朱林, 张高红, 郑永唐. 2010. 动物模型在 HIV-1 杀微生物剂有效性和安全性评价中的应用. 动物学研究, **31**(1): 66-76.]

动　物　学　研　究　2013，Apr. 34(2): 89−96　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2013.02089

北平顶猴（*Macaca leonina*）血液学和血液生化指标参考值的测定与分析

庞　伟[1,#]，吕龙宝[1,2,#]，王　芸[2]，李　贵[2]，黄东体[2]，雷爱华[1,3]，张高红[1]，郑永唐[1,2,*]

1. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室，云南 昆明　650223
2. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院昆明灵长类研究中心，云南 昆明　650223
3. 中国科学院大学，北京　100049

摘要：平顶猴是重要的非人灵长类实验动物，广泛应用于艾滋病等重大疾病的动物模型研究。平顶猴分为明打威猴、巽他平顶猴和北平顶猴三个种。我国及周边东南亚国家分布的平顶猴为北平顶猴。该文测定和分析了青幼年 (2～4 a) 和成年 (5～10 a) 北平顶猴的血液学和血液生化指标参考值。结果表明个体性别、年龄和体重等对该指标均有影响。雌性个体的红细胞数、血红蛋白和碱性磷酸酶均低于雄性个体。青幼年个体的白细胞数、淋巴细胞数、单核细胞数、血小板分布宽度、碱性磷酸酶、天冬氨酸转氨酶和胆固醇均高于成年猴，而肌酐和甘油三酯则低于成年猴。个体体重与青年猴的平均血红蛋白含量和肌酐正相关，与成年猴的平均血红蛋白含量、粒细胞百分比、血红蛋白和肌酐正相关，而与成年猴的淋巴细胞数、淋巴细胞百分比、红细胞分布宽度变异系数、天冬氨酸转氨酶和胆固醇负相关。该研究提供的北平顶猴血液学和血液生化指标参考值范围，对其基础研究、疾病诊断和模型建立等具有重要意义。

关键词：实验动物；灵长类动物；北平顶猴；血液学；血液生化；参考值
中图分类号：Q955, Q952, Q95-3　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0254-5853-(2013)02-0089-08

Measurement and analysis of hematology and blood chemistry parameters in northern pig-tailed macaques (*Macaca leonina*)

Wei PANG[1,#], Long-Bao LV[1,2,#], Yun WANG[2], Gui LI[2], Dong-Ti HUANG[2], Ai-Hua LEI[1,3], Gao-Hong ZHANG[1], Yong-Tang ZHENG[1,2,*]

1. *Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming*　650223, *China;*
2. *Kunming Primate Research Center, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming*　650223, *China*；
3. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing*　100049, *China*

Abstract: The pig-tailed macaque is an important non-human primate experimental animal model that has been widely used in the research of AIDS and other diseases. Pig-tailed macaques include Mentawai macaques (*Macaca pagensis*), Sunda pig-tailed macaques (*M. nemestrina*) and northern pig-tailed macaques (*M. leonina*). Northern pig-tailed macaques inhabit China and surrounding Southeast Asia countries. To our knowledge, no reports have been published regarding the hematology and blood chemistry parameters of northern pig-tailed macaques, which are important for the objective evaluation of experimental results. We measured and analyzed 18 hematology parameters and 13 blood chemistry parameters in juvenile (aged 2−4 years) and adult (aged 5−10 years) northern pig-tailed macaques. We found that red blood cells, hemoglobin and alkaline phosphatase values were lower in female macaques than male macaques in both juvenile and adult groups. White blood cells, lymphocyte, monocytes, platelet distribution width, cholesterol, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase values were higher in juvenile macaques than adult macaques, while creatinine and triglycerides values were lower in juvenile macaques. Mean corpuscular hemoglobin and creatinine values were

收稿日期：2013-01-21；接受日期：2013-02-09
基金项目：国家自然科学基金 (81172876, U0832601, 81273251, U1202228)；国家重大科学研究计划课题 (2012CBA01305)；国家科技重大专项课题 (2013ZX10001-002)；中国科学院知识创新工程重要方向 (KSCX2-EW-R-13)
[*]通信作者(Corresponding author)，E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn
#共同第一作者(Authors contributed equally to the work)
第一作者简介：庞伟 (1978−)，男，博士，助理研究员，现主要从事艾滋病灵长类动物模型研究; 吕龙宝(1974−)，男，硕士，工程师，从事实验动物学研究

positively correlated with weight in juvenile groups. In adult groups, mean corpuscular hemoglobin, percentage of granulocyte, hemoglobin and creatinine were also positively correlated with weight, and lymphocyte, percentage of lymphocyte, red cell distribution width, aspartate aminotransferase and cholesterol values were negatively correlated with weight. The results suggest that age, gender and weight of northern pig-tailed macaques affected their hematology and blood chemistry parameters. This hematological and blood chemistry study has great significance in biomedical research and animal models using northern pig-tailed macaque as an experimental animal.

Keywords: Experimental animal; Primates; Northern pig-tailed macaque (*Macaca leonina*); Hematology; Blood chemistry; Parameters

平顶猴 (pig-tailed macaque, *Macaca nemestrina* group)，又称“豚尾猴”或“猪尾猴”。因头顶平而有一毛旋，尾巴形似猪尾而得名。1992 年，美国华盛顿大学国家灵长类研究中心 Agy et al (1992) 发现平顶猴可感染 HIV-1 病毒，是潜在的艾滋病模型动物。目前，平顶猴已和恒河猴 (rhesus macaques, *Macaca mulatta*)、食蟹猴 (cynomolgus macaques, *Macaca fascicularis*) 一起，发展成为最常用的非人灵长类艾滋病实验动物 (Hatziioannou & Evans, 2012)。在旧大陆猴中，与恒河猴和食蟹猴相比，平顶猴的优点在于能急性感染 HIV-1 且对某些 SIV/SHIV 更易感 (Lei et al, 2013)。而且，平顶猴生殖道组织结构及月经周期与人很相似，全年均可繁殖，非常适合作为性传播疾病模型动物模型 (Patton et al, 2009)。此外，在神经 (Hukkanen et al, 2006)、认知 (Macellini et al, 2010) 和药物代谢 (Weed et al, 2008) 等研究领域，平顶猴也得到了越来越多的应用。

随着平顶猴在生物医学研究中的广泛应用，其分类地位也得到重视。2001 年，根据地理隔离造成的种群分离及形态学区别，分类学家将平顶猴 (*M. nemestrina* group) 原来的 3 个亚种提升为猕猴属的 3 个种：明打威猴 (Mentawai macaques, *M. pagensis*)、巽他平顶猴或南平顶猴 (Sunda pig-tailed macaque or Southern pig-tailed macaque, *M. nemestrina*) 和北平顶猴 (northern pig-tailed macaque, *M. leonina*) (Gippoliti et al, 2001; Groves et al, 2001)。明打威猴分布于印尼以及苏门达腊岛南部的明打威群岛，北平顶猴和南平顶猴在东南亚国家和南亚国家广泛分布，以 N8°30′为界，以北为北平顶猴，以南为南平顶猴，中间稍有分布重叠 (Malaivijitnond et al, 2012)，而我国分布的平顶猴为北平顶猴。

目前，缺少对 HIV-1 易感的动物模型仍然是制约人类对抗 HIV/AIDS 的一大瓶颈。2007 年，我们实验室首次发现北平顶猴不表达限制 HIV-1 复制的 TRIM5α 蛋白，而 TRIM5α 与亲环蛋白 A (cyclophilin A) 形成 *TRIM5-CypA* 融合基因，且该融合基因产物不限制 HIV-1 的复制，阐明了平顶猴对 HIV-1 易感的分子机制，同时也在细胞水平上也证实了北平顶猴是较理想的艾滋病模型动物 (Cao et al, 2012; Kuang et al, 2009; Liao et al, 2007)。随后, 国际上多个实验室证实了我们的实验结果, 并相继在同属于旧大陆猴的巽他平顶猴、食蟹猴、印度恒河猴和熊猴中也发现存在 *TRIMCyp* 融合基因 (Brennan et al, 2008; Cao et al, 2011; Newman et al, 2008; Virgen et al, 2008; Wilson et al, 2008)。因此，北平顶猴可能是较理想的 HIV 感染模型动物。

野生北平顶猴在我国分布较少，主要栖息于云南西南部和西藏东南部，是国家 I 级重点保护灵长类动物。在国外广泛分布于缅甸、越南、泰国、马来半岛和印度支那等东南亚和南亚地区。我国各实验动物饲养中心也无北平顶猴规模化繁殖饲养种群，从而制约了北平顶猴作为实验动物的使用。2012 年，中国科学院昆明动物研究所/中国科学院昆明灵长类研究中心从越南引进了一批北平顶猴。由于至今尚无北平顶猴血液学和血液生化指标参考值的报道，因此，在本研究中，我们对北平顶猴血液学和血液生化指标进行测定，同时分析和比较了在不同年龄阶段下和不同性别间北平顶猴血液学和血液生化指标的差异, 这些数据将为建立北平顶猴实验动物模型提供血液学指标的正常参考值范围。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究所用北平顶猴引进自越南胡志明市某猴饲养中心。其北平顶猴为人工饲养群。引进中国后，在云南省元江猴场单笼饲养，经检疫无病原微生物及寄生虫感染。渡过检疫期 45 d 后，运至中国科学院昆明灵长类中心单笼饲养适应环境 1 个月。

实验动物许可证号：SYXK(滇)2008－0001，国家重点保护野生动物驯养繁殖许可证号：滇发驯繁 92－29 号。猴群均采用膨化饲料喂养，自由饮水。按文献报道的猴群年龄分类方法 (Dai et al, 2000; Haberthur et al, 2010)，将猴群分为青幼年组 (2～4 a) 和成年组 (5～10 a)。各年龄组按性别分类统计。

1.2　血样采集和体重称量

在北平顶猴清醒状态下，清晨空腹后肢静脉采取乙二胺乙酸二钾 (EDTA-K2) 抗凝血 1 mL，非抗凝血 2～3 mL。全血凝结后，2500 r/mim 离心 20 min 分离血清待用。抗凝血用于检测血液学指标，血清用于检测血液生化指标。采血后，用网兜固定猴体称量体重。

1.3　血液学指标检测方法

应用迈瑞 BC-2800vet 全自动动物血液细胞分析仪测定白细胞数 (white blood cell, WBC)、淋巴细胞数 (lymphocyte, Lymph)、单核细胞数 (monocytes, Mon)、粒细胞数 (granulocyte, Gran)、淋巴细胞百分比(Lymph%)、单核细胞百分比(Mon%)、粒细胞百分比 (Gran%)、红细胞数 (red blood cell, RBC)、血红蛋白 (hemoglobin, HGB)、红细胞压积 (hematocrit, HCT)、平均红细胞体积 (mean corpuscular volume, MCV)、平均血红蛋白含量 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均血红蛋白浓度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、红细胞分布宽度变异系数 (red cell distribution width, RDW)、血小板数 (Platelet, PLT)、平均血小板体积 (mean platelet volume, MPV)、血小板分布宽度 (platelet distribution width, PDW) 和血小板压积 (platelet hematocrit, PCT)。

1.4　血液生化指标检测方法

采用罗氏 COMBAS INTEGAR 400 plus 全自动生化仪测定血清中的白蛋白 (albumin)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase)、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase)、肌酐 (creatinine)、钙 (calcium)、胆固醇 (cholesterol)、肌酸激酶 (creatine kinase)、葡萄糖 (glucose)、总胆红素 (total bilirubin)、总蛋白 (total protein)、甘油三酯 (triglycerides) 和尿素氮 (urea nitrogen)含量。

1.5　统计学分析

使用 SPSS19.0 统计学软件进行统计学分析。首先，检测各组数据是否符合正态分布，正态分布实验数据以 mean±*SD* 表示，采用独立样本 *t*-test 比较各测定组间差异，采用单样本 *t*-test 比较同年龄段北平顶猴与恒河猴或食蟹猴各测定组的差异。以年龄和性别为控制变量，以体重和各检测项目值为变量，采用偏相关分析各年龄组体重对各检测项目值的影响。非正态分布实验数据以中位数±四分位数间距表示，采用非参数检验中的 Mann-Whitney 检验比较含非正态分布的实验数据的各测定组间差异。

2　结　果

2.1　青幼年北平顶猴血液学指标参考值检测及其分析

2～4 a 青幼年北平顶猴的血液学指标参考值及范围见表 1。在青幼年北平顶猴中，除雌性个体红细胞数低于雄性个体外 (P=0.027)，其他检测影响雌、雄间差异不明显。去除年龄和性别的影响后，体重对青幼年北平顶猴血液学指标的影响也不显著，仅平均血红蛋白含量与体重相关性有统计学意义 (R=0.39; P=0.0040)。

2.2　青幼年北平顶猴血液生化指标参考值检测及其分析

2～4 a 青幼年北平顶猴的血液生化指标参考值及范围见表 2。在青幼年北平顶猴中，血液生化指标雌、雄间差异较大：雌性猴个体的丙氨酸转氨酶 (P=0.013)和总胆红素 (P=0.018)高于雄性个体，而碱性磷酸酶 (P=0.00036)、胆固醇 (P=0.031)、肌酐 (P=0.024)、钙 (P=0.016)和白蛋白 (P=0.050)等则低于雄性个体，其中碱性磷酸酶在雌、雄之间差异极显著，其他检测指标差异不明显。去除年龄和性别的影响后，体重对青幼年北平顶猴血液生化指标的影响不显著，仅肌酐与体重明显正相关 (R=0.31; P=0.038)。

2.3　成年北平顶猴血液学指标参考值检测及其分析

5～10 a 成年北平顶猴的血液学指标及范围见表 3。在成年北平顶猴中，雌性个体的红细胞数 (P=0.0054)、血红蛋白 (P=0.00068)和红细胞压积 (P=0.0046)等明显低于雄性个体。去除年龄和性别的影响后，平均血红蛋白含量 (R=0.36; P=0.010)、粒细胞百分比(R=0.31; P=0.026)和血红蛋白(R=0.31; P=0.027)与体重正相关，而淋巴细胞数(R=−0.32; P=0.022)、淋巴细胞百分比(R=−0.28; P=0.043)和红

表1 青幼年(2～4 a)北平顶猴不同性别间血液学指标正常值参考范围

Table 1 Normal hematology values in female and male juvenile northern pig-tailed macaques aged 2−4 years

青幼年组(2～4 a) Juveniles (2−4 years)	雌猴 Females (*n*=15)	雄猴 Males (*n*=38)	总体 Total (*n*=53)		性别差异 Gender effect	体重影响 Age effect	
项目 Items	平均值±标准差 Mean±*SD*	平均值±标准差 Mean±*SD*	平均值±标准差 Mean±*SD*	范围 Range	*P*值 *P* Values	相关系数 Coefficient of correlation(R)	*P*值 *P* Values
白细胞数 WBC (10^9/L)	17.57±3.53	16.73±5.28	16.97±4.83	6.00−31.40	0.58	0.047	0.75
淋巴细胞数 Lymph (10^9/L)	7.14±2.09	7.50±1.86	7.40±1.91	3.70−12.90	0.54	−0.17	0.22
单核细胞数 Mon (10^9/L)	1.71±0.61	1.73±0.59	1.72±0.59	0.70−3.60	0.93	0.036	0.81
粒细胞数 Gran (10^9/L)	8.71±3.16	7.50±4.23	7.85±3.97	1.60−20.10	0.32	0.14	0.34
淋巴细胞百分比 Lymph (%)	41.27±11.49	46.98±10.44	45.36±10.95	21.10−64.10	0.087	−0.20	0.16
单核细胞百分比 Mon (%)	9.08±3.02	10.61±2.56	10.18±2.76	1.10−18.10	0.068	−0.082	0.57
粒细胞百分比 Gran (%)	48.98±12.49	42.41±11.12	44.27±11.78	26.50−73.60	0.067	0.19	0.17
红细胞数 RBC (10^{12}/L)	5.97±0.48	6.33±0.53	6.23±0.54	5.00−7.21	0.027	−0.13	0.37
血红蛋白 HGB (g/L)	128.47±9.88	134.42±10.73	132.74±10.75	100.00−153.00	0.069	0.10	0.47
红细胞压积 HCT (%)	42.47±3.23	43.98±3.21	43.55±3.26	34.60−49.10	0.13	0.0059	0.97
平均红细胞体积 MCV (fL)	71.35±2.80	69.68±3.17	70.15±3.14	64.00−77.80	0.081	0.23	0.098
平均血红蛋白含量 MCH (pg)	21.51±0.93	21.21±0.99	21.30±0.98	19.30−23.10	0.33	0.39	0.0040↑
平均血红蛋白浓度 MCHC (g/L)	307.53±24.19	306.11±10.42	306.51±15.34	289.00−390.00	0.76	0.096	0.51
红细胞分布宽度变异系数 RDW (%)	14.67±0.78	14.67±1.13	14.67±1.04	11.80−17.30	0.98	−0.11	0.43
血小板数 PLT (10^9/L)	429.47±203.37	375.00±170.06	390.42±179.80	48.00−774.00	0.33	−0.042	0.77
平均血小板体积 MPV (fL)	8.73±0.83	8.35±0.65	8.46±0.72	7.10−10.10	0.084	0.062	0.67
血小板分布宽度 PDW	16.81±0.58	16.85±0.75	16.84±0.70	15.60−19.20	0.85	0.049	0.74
血小板压积 PCT (%)	0.37±0.17	0.31±0.14	0.33±0.15	0.04−0.61	0.23	−0.042	0.77

表2 青幼年(2～4 a)北平顶猴不同性别间血液生化指标正常值参考范围

Table 2 Normal blood chemistry parameter values in juvenile northern pig-tailed macaques aged 2−4 years

青幼年组 Juveniles	雌猴 Females (*n*=15)	雄猴 Males (*n*=32)	总体 Total (*n*=47)		性别差异 Gender effect	体重影响 Age effect	
项目 Items	平均值±标准差 Mean±*SD*	平均值±标准差 Mean±*SD*	平均值±标准差 Mean±*SD*	范围 Range	*P*值 *P* Values	相关系数 Coefficient of correlation(R)	*P*值 *P* Values
白蛋白 Albumin (g/L)	42.52±3.11	44.39±2.92	43.79±3.07	34.26−49.81	0.050	−0.09	0.58
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase (IU/L)	676.40±626.30◆	1341.58±433.40	1167.19±516.48	291.10−2448.70	0.00036	0.017	0.91
丙氨酸转氨酶 Alanine aminotransferase (IU/L)	37.49±16.35	25.25±7.71	29.16±12.44	1.70−71.10	0.013	0.060	0.69
天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotransferase (IU/L)	43.51±14.84	41.55±8.49	42.18±10.79	18.30−75.50	0.639	0.081	0.60
肌酐 Creatinine (μmol/L)	45.00±6.50	50.88±8.68	49.00±8.44	34.00−69.00	0.024	0.31	0.038↑
钙 Calcium (mmol/L)	2.06±0.12	2.16±0.13	2.13±0.13	1.84−2.49	0.016	−0.10	0.53
胆固醇 Cholesterol (mmol/L)	3.20±0.39	3.51±0.47	3.41±0.47	2.29−4.69	0.031	0.090	0.56
肌酸激酶 Creatine kinase (IU/L)	400.33±247.46	361.50±314.00◆	367.00±299.00◆	117.00−1114.00	0.51	0.26	0.079
葡萄糖 Glucose (mmol/L)	5.20±1.09	5.63±1.51	5.49±1.39	2.73−8.75	0.33	−0.21	0.17
总胆红素 Total bilirubin (μmol/L)	2.67±0.98	2.02±0.77	2.23±0.88	0.90−5.00	0.018	0.18	0.25
总蛋白 Total protein (g/L)	79.09±4.33	78.94±4.44	78.99±4.36	65.20−88.30	0.91	0.00014	1.00
甘油三酯 Triglycerides (mmol/L)	0.55±0.15	0.62±0.16	0.60±0.16	0.31−1.01	0.15	0.067	0.66
尿素氮 Urea nitrogen (mmol/L)	7.20±1.19	7.72±1.45	7.56±1.38	5.34−12.43	0.23	0.0015	0.99

◆：数据为非正态分布，以中位数±四分位数间距表示。◆：The data are not distributed in a normal fashion; presented as median±interquartile range.

表 3　成年(5～10 a)北平顶猴不同性别间血液学指标正常值参考范围

Table 3　Normal hematology values in female and male adult northern pig-tailed macaques aged 5−10 years.

成年组(5～10 a) Adults (5−10 years)	雌猴 Females (*n*=32)	雄猴 Males (*n*=21)	总体 Total (*n*＝53)		性别差异 Gender effect	体重影响 Age effect	
项目 Items	平均值±标准差 Mean±*SD*	平均值±标准差 Mean±*SD*	平均值±标准差 Mean±*SD*	范围 Range	*P* 值 *P* Values	相关系数 Coefficient of correlation (R)	*P* 值 *P* Values
白细胞数 WBC (10^9/L)	13.90±3.64	14.54±3.82	14.15±3.69	6.50−25.80	0.54	0.069	0.63
淋巴细胞数 Lymph(10^9/L)	5.75±1.56	6.76±2.15	6.15±1.86	2.00−10.80	0.053	−0.32	0.022↓
单核细胞数 Mon (10^9/L)	1.23±0.42	1.41±0.50	1.30±0.46	0.50−2.50	0.15	−0.12	0.41
粒细胞数 Gran (10^9/L)	6.92±3.22	6.37±3.95	6.70±3.50	1.80−20.70	0.58	0.25	0.072
淋巴细胞百分比 Lymph (%)	42.59±11.44	48.23±13.69	44.83±12.56	14.80−63.00	0.11	−0.28	0.043↓
单核细胞百分比 Mon (%)	9.18±3.01	10.08±3.39	9.54±3.16	4.50−18.00	0.32	−0.14	0.32
粒细胞百分比 Gran (%)	48.22±11.61	41.69±14.22	45.63±12.98	25.20−80.10	0.073	0.31	0.026↑
红细胞数 RBC (10^{12}/L)	6.10±0.54	6.55±0.55	6.28±0.58	5.39−7.75	0.0054	0.028	0.85
血红蛋白 HGB (g/L)	128.00±8.83	137.67±10.50	131.83±10.57	109.00−155.00	0.00068	0.31	0.027↑
红细胞压积 HCT (%)	42.60±3.47	45.45±3.36	43.73±3.67	37.20−53.70	0.0046	0.14	0.31
平均红细胞体积 MCV (fL)	69.96±2.13	69.65±2.83	69.83±2.41	61.30−75.50	0.65	0.25	0.075
平均血红蛋白含量 MCH (pg)	20.98±0.98	21.03±1.27	21.00±1.10	17.20−23.20	0.85	0.36	0.010↑
平均血红蛋白浓度 MCHC (g/L)	303.03±20.88	302.57±10.38	302.85±17.36	253.00−390.00	0.93	0.17	0.25
红细胞分布宽度变异系数 RDW (%)	14.88±1.41	15.46±1.85	15.11±1.61	12.10−21.50	0.21	−0.34	0.015↓
血小板数 PLT (10^9/L)	449.47±172.01	444.14±218.82	447.36±189.90	61.00−848.00	0.92	−0.23	0.11
平均血小板体积 MPV(fL)	8.70±0.85	8.37±0.84	8.57±0.85	6.00−10.80	0.17	−0.038	0.79
血小板分布宽度 PDW	16.41±0.50	16.54±0.73	16.46±0.60	15.60−18.40	0.42	0.16	0.27
血小板压积 PCT (%)	0.39±0.15	0.37±0.17	0.38±0.16	0.04−0.67	0.61	−0.22	0.13

细胞分布宽度变异系数 (*R*=−0.34; *P*=0.015)与体重负相关。

2.4　成年北平顶猴血液生化指标参考值检测及其分析

5～10 a 成年北平顶猴的血液生化指标见表 4。在成年北平顶猴中，雌性个体的尿素氮略高于雄性个体 (*P*=0.036)，白蛋白略低于雄性个体 (*P*=0.016)，肌酸激酶 (*P*=0.000088)和碱性磷酸酶 (*P*=0.0000062)明显低于雄性个体。去除年龄和性别的影响后，肌酐与体重明显正相关(*R*=0.43; *P*=0.0017)，而天冬氨酸转氨酶 (*R*=−0.37; *P*=0.0069)和胆固醇 (*R*=−0.41; *P*=0.0026)与体重负相关。

2.5　青幼年与成年北平顶猴血液学指标的比较

比较青幼年与成年北平顶猴总体的血液指标可见，年龄对北平顶猴血液学指标的影响主要体现为免疫细胞的差异。成年北平顶猴的白细胞数 (*P*=0.0011)、淋巴细胞数 (*P*=0.00094)、单核细胞数 (*P*=0.000068)和血小板分布宽度 (*P*=0.0036)均极显著低于青幼年猴。

2.6　青幼年与成年北平顶猴血液生化指标的比较

比较青幼年与成年北平顶猴血液生化指标可见，成年北平顶猴的碱性磷酸酶 (*P*=0.000000039)、天冬氨酸转氨酶 (*P*=0.00010)和胆固醇 (*P*=0.00051)等均极显著低于青幼年猴。而肌酐 (*P*=0.0024)和甘油三酯 (*P*=0.040)则高于青幼年猴。该结果说明年龄同样是影响北平顶猴血液生化指标的重要因素。

3　讨　论

随着生物医学研究的发展，对实验动物的要求也愈加严格。实验动物的标准化和背景清晰化直接影响诸多研究领域的确立和对实验结果的评价。目前，平顶猴已成为广泛应用的非人灵长类实验动物。但是，大多数关于平顶猴的研究报道对其种类和来源均无描述 (Moss et al, 2012; Balagopal et al, 2012)，直接影响了后续研究的标准化和连续性。而且，对平顶猴的部分生物学特征的研究尚处于起步

表4 成年(5～10岁)北平顶猴不同性别间血液生化指标正常值参考范围

Table 4 Normal blood chemistry parameter values in adult northern pig-tailed macaques aged 5−10 years.

成年组 Adults	雌猴 Females (*n*=35)	雄猴 Males (*n*=19)	总 Total (*n*=54)		性别差异 Gender effect	体重影响 Age effect	
项目 Items	平均值±标准差 Mean±*SD*	平均值±标准差 Mean±*SD*	平均值±标准差 Mean±*SD*	范围 Range	*P*值 *P* Values	相关系数 Coefficient of correlation(R)	*P*值 *P* Values
白蛋白 Albumin (g/L)	42.43±3.75	44.99±3.35	43.33±3.79	34.76−51.00	0.016	−0.11	0.44
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase (IU/L)	281.40±195.20◆	992.82±491.15	372.85±494.88◆	114.10−1789.20	0.0000062	−0.10	0.47
丙氨酸转氨酶 Alanine aminotransferase (IU/L)	30.51±11.77	27.61±15.88	29.49±13.29	14.00−85.40	0.45	−0.18	0.20
天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotransferase (IU/L)	30.52±8.51	36.83±16.97	32.74±12.39	18.50−101.40	0.074	−0.37	0.0069↓
肌酐 Creatinine (μmol/L)	53.57±8.41	56.84±11.91	54.72±9.80	38.00−88.00	0.25	0.43	0.0017↑
钙 Calcium (mmol/L)	2.13±0.14	2.16±0.16	2.14±0.15	1.95−2.59	0.47	−0.26	0.067
胆固醇 Cholesterol (mmol/L)	3.12±0.46	3.00±0.51	3.07±0.48	2.06−4.05	0.38	−0.41	0.0026↓
肌酸激酶 Creatine kinase (IU/L)	157.00±106.00◆	354.00±266.00◆	198.50±208.25◆	64.00−2582.00	0.000088	−0.078	0.66
葡萄糖 Glucose (mmol/L)	5.34±1.30	5.35±1.38	5.34±1.31	3.49−8.21	0.97	−0.062	0.40
总胆红素 Total bilirubin (μmol/L)	2.33±1.20	2.43±1.08	2.36±1.15	0.80−5.80	0.76	0.12	0.48
总蛋白 Total protein (g/L)	80.52±4.63	79.05±4.09	80.00±4.47	70.60−87.90	0.25	−0.10	0.46
甘油三酯 Triglycerides (mmol/L)	0.70±0.22	0.65±0.28	0.68±0.24	0.31−1.58	0.49	0.11	0.95
尿素氮 Urea nitrogen (mmol/L)	7.69±1.31	6.93±1.10	7.42±1.28	4.63−10.69	0.036	−0.0095	0.44

◆：数据为非正态分布，以中位数±四分位数间距表示。◆：Data are not distributed in a normal fashion; presented as median ± interquartile range.

阶段 (Reeves & Fultz, 2008)，对广泛分布于东南亚国家和地区的北平顶猴的基础生物学特征研究则尚属空白 (Malaivijitnond et al, 2012)。

我国和周边国家分布的平顶猴群为北平顶猴，在将其发展成为实验动物时，有必要对其遗传及生理生化基础指标进行测定和研究。血液是机体的主要运输和物质交换系统，具有维持机体内环境稳定的功能，血液学指标是反映机体状况的重要标志。血液生理生化值能在一定程度上反映动物的代谢、生理机能状况及物种特征等。本研究首次测定了北平顶猴的18项血液学指标和13项血液生化指标参考值及范围，并对这些指标进行了统计学分析。

根据以往报道，年龄、性别和体重等都有可能影响猕猴的血液学和血液生化指标 (Schuurman & Smith 2005; Smucny et al, 2004)。我们将北平顶猴分为2～4 a的青幼年猴和5～10 a的成年猴，发现在各年龄段的北平顶猴中，性别间的血液学指标差异主要为红细胞和血红蛋白差异：雌性青幼年平顶猴的红细胞数显著低于雄性，血红蛋白和红细胞压积也低于雄性，但差异不明显；而雌性成年平顶猴的红细胞数、血红蛋白、红细胞压积和碱性磷酸酶等均极显著低于雄性。这与中国恒河猴和雌、雄食蟹猴间的差异一致 (Liu & Xie, 2012)。有报道称中国恒河猴和雌、雄食蟹猴间的淋巴细胞存在差异 (Lee et al, 2012; Liu & Xie, 2012)，在北平顶猴中却未发现该差异。血液生化指标性别间的差异在青幼年北平顶猴中较大，而在成年北平顶猴中较小。这可能和青幼平顶猴不同性别间生长发育状态的不同有关。但在不同的年龄组中，雌性北平顶猴的碱性磷酸酶均显著低于雄性。已报道的雌、雄食蟹猴间也存在该差异，而且雌、雄食蟹猴间天冬氨酸转氨酶和丙氨酸转氨酶也存在显著差异 (Liu & Xie, 2012)，在北平顶猴中亦未观察到该差异。雌、雄中国恒河猴的碱性磷酸酶无差异 (Chen et al, 2009; Lee et al, 2012)。

不同年龄组的比较血液学指标表明，青幼年北平顶猴的各类白细胞数目和血小板分布宽度均高于成年个体，这与人类中儿童和成人的血常规差异一致。而Dai et al (2000)报道在不同年龄组的中国恒河猴中，青幼年与成年个体无明显差异，仅血小板分布宽度低于成年个体。这可能和猴子种类或实验方法及抽样误差等相关。另外，比较血液生化指标表明，成年北平顶猴的碱性磷酸酶、天冬氨酸转氨酶及胆固醇等均低于青幼年北平顶猴，在中国恒

河猴中也存在该现象 (Dai et al, 2000)。但甘油三酯和肌氨酸酐在中国恒河猴中的结果却与北平顶猴相反，为成年猴低于青幼年猴。由于未查阅到青幼年与成年食蟹猴血液学和血液生化指标的数据，因此本文未比较其差异。

以往的报道均未分析除年龄和性别外，体重对猕猴血液学和生化指标的影响，我们发现，在青幼年北平顶猴中，体重因素只与平均血红蛋白含量和肌酐正相关，但在成年北平顶猴中，体重与多个血液学和血液生化指标相关。该结果提示在相关研究中，体重可能是需要考虑的因素。

此外，由于在性别间和不同年龄组中，北平顶猴的血液学和血液生化指标与中国恒河猴和食蟹猴的差异不同。因此，我们进一步选择均有报道的同年龄段的中国恒河猴 (Chen et al, 2009)和食蟹猴 (Liu & Xie, 2012)与北平顶猴比较。发现在 3～5 a 的年龄段内，北平顶猴与中国恒河猴或食蟹猴的血液学和血液生化指标正常值差异较大，而中国恒河猴和食蟹猴之间的血液学和血液生化指标差异相对较小 (数据未列出)。北平顶猴与中国恒河猴比较，仅白细胞数、平均血红蛋白浓度、天冬氨酸转氨酶和葡萄糖等无明显差异，而与食蟹猴相比，仅血小板压积无明显差异。血液学指标相差最大的是单核细胞数和单核细胞百分比，北平顶猴的平均值高于中国恒河猴 4 倍，高于食蟹猴 1.6 倍。血液生化指标相差最大的碱性磷酸酶，北平顶猴的碱性磷酸酶平均值高于中国恒河猴和食蟹猴 2 倍，而丙氨酸转氨酶却低于两者 1.6 倍。也有其他研究通过 Y 染色体和线粒体的DNA进化分析，发现平顶猴在～500 万年前就与恒河猴猴和食蟹猴产生了分歧，而恒河猴和食蟹猴则在 240 万年后才出现分歧 (Tosi et al, 2000)，这与血液学和血液生化指标结果一致。初步说明在猕猴属中，北平顶猴可能是一个相对于中国恒河猴和食蟹猴有较大差异的种群。

本实验得到的血液学和血液生化数据均来源于经检疫后的健康北平顶猴，在分析该群体后发现：(1) 性别间的差异主要体现为红细胞数、血红蛋白量和碱性磷酸酶等的不同，可能和雌、雄个体的运动和耗能不同相关；(2) 年龄间的差异则表现为免疫细胞和代谢酶类不同，其中，白细胞数、淋巴细胞数和单核细胞数等在成年后下降，可能和不同生长发育阶段中免疫系统成熟过程相关，而碱性磷酸酶和天冬氨酸转氨酶在成年后下降，则可能和青幼年猴生长过程中的较快代谢相关；3) 体重对成年猴的影响大于青幼年猴，可能与成年猴的营养状态、社会等级和遗传特性等有一定关联。因此，在今后的动物管理和实验动物选择中，应考虑这些因素对北平顶猴血液学的影响。另外，一些本研究未分析但需要提及的因素包括：(1) 由于该批猴均来源于越南，其产地和品系是否对其血液学数据有一定影响；(2) 该批猴为引进的人工饲养猴群，与我国野生北平顶猴相比，其生活环境及营养状态存在一定的差异。这些差异是否与群体间的血液学和血液生化数据相关，还有待进一步研究证实。总之，本文得到了不同年龄段内较大规模的北平顶猴血液学和血液生化正常参考值指标，并分析了年龄、性别和体重对这些指标的影响，为将来北平顶猴饲养管理中的疾病诊断和分析，实验动物数据库的建立及其疾病动物模型发展提供了参考数据。

参考文献：

Agy MB, Frumkin LR, Corey L, Coombs RW, Wolinsky SM, Koehler J, Morton WR, Katze MG. 1992. Infection of *Macaca nemestrina* by human immunodeficiency virus type-1. *Science*, **257**(5066): 103-106.

Balagopal A, Gama L, Franco V, Russell JN, Quinn J, Higgins Y, Smeaton LM, Clements JE, Thomas DL, Gupta A; NWCS 319 and ACTG 5175 study team. 2012. Detection of microbial translocation in HIV and SIV infection using the Limulus amebocyte lysate assay is masked by serum and plasma. *PLoS One*, **7**(8): e41258.

Brennan G, Kozyrev Y, Hu SL. 2008. TRIMCyp expression in Old World primates *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(9): 3569-3574.

Cao G, Liu FL, Zhang GH, Zheng YT. 2012. The primate *TRIMCyp* fusion genes and mechanism of restricting retroviruses replication. *Zoological Research*, **33**(1): 99-107 [曹光, 刘丰亮, 张高红, 郑永唐. 2012. 灵长类动物中 *TRIMCyp* 融合基因模式及对逆转录病毒复制的限制作用. 动物学研究, **33**(1): 99-107].

Cao G, Nie WH, Liu FL, Kuang YQ, Wang JH, Su WT, Zheng YT. 2011. Identification of the *TRIM5*/*TRIMCyp* heterozygous genotype in *Macaca assamensis*. *Zoological Research*, **32**(1): 40-49. [曹光, 佴文惠, 刘丰亮, 况轶群, 王金焕, 苏伟婷, 郑永唐. 2011. 熊猴存在 *TRIM5*/*TRIMCyp* 杂合子基因型. 动物学研究, 2011, **32**(1): 40-49.]

Chen Y, Qin S, Ding Y, Wei L, Zhang J, Li H, Bu H, Lu Y, Cheng J. 2009. Reference values of clinical chemistry and hematology parameters in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Xenotransplantation*, **16**(6): 496-501.

Dai J, Tang D, Lu S, Kuang D, Yang F, Cheng S, Huang R. 2000. Clinical normal values of hematology and serum biochemistry in domestically bred and reared rhesus monkeys. *Acta Laboratorium Scientia Sinica*, **8**(4): 224-230. [代解杰, 唐东红, 鲁帅尧, 匡德宣, 杨帆, 树军, 黄韧. 2000. 人工饲养条件下恒河猴血液学、血液生化正常参考值测定及分析. 中国实验动物学报, **8**(4): 224-230.]

Gippoliti S. 2001. Notes on the taxonomy of *Macaca nemestrina leonina* blyth, 1863 (Primates: Cercopithecidae). *Hystrix, the Italian Journal of Mammalog*, **12**(1): 51-54.

Groves CP. 2001. Primate Taxonomy. Washington, DC, USA: Smithsonian Institution Press, 222-224.

Haberthur K, Engelman F, Barron A, Messaoudi I. 2010. Immune senescence in aged nonhuman primates. *Experimental Gerontology*, **45**(9): 655-661.

Hatziioannou T, Evans DT. 2012. Animal models for HIV/AIDS research. *Nature Reviews Microbiology*, **10**(12): 852-867.

Hukkanen RR, Liggitt HD, Anderson DM, Kelley ST. 2006. Detection of systemic amyloidosis in the pig-tailed macaque (*Macaca nemestrina*). *Comparative Medicine*, **56**(2): 119-127.

Kuang YQ, Tang X, Liu FL, Jiang XL, Zhang YP, Gao GX, Zheng YT. 2009. Genotyping of TRIM5 locus in northern pig-tailed macaques (*Macaca leonina*), a primate species susceptible to Human Immunodeficiency Virus type 1 infection. *Retrovirology*, **6**(1): 58.

Lee JI, Shin JS, Lee JE, Jung WY, Lee G, Kim MS, Park CG, Kim SJ. 2012. Reference values of hematology, chemistry, electrolytes, blood gas, coagulation time, and urinalysis in the Chinese rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Xenotransplantation*, **19**(4): 244-248.

Lei AH, Pang W, Zhang GH, Zheng YT. 2013. The use and research of pigtailed macaques for AIDS nonhuman primate models: An overview. *Zoological Research*, **34**(2): 77-88. [雷爱华, 庞伟, 张高红, 郑永唐. 2013. 平顶猴在 HIV/AIDS 动物模型中的应用及研究进展. 动物学研究, **34**(2): 77-88.]

Liao CH, Kuang YQ, Liu HL, Zheng YT, Su B. 2007. A novel fusion gene, TRIM5-Cyclophilin A in the pig-tailed macaque determines its susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS*, **21**(Suppl 8): S19-S26.

Liu SG, Xie L. 2012. Measurement of hematological and serum biochemical parameters in feeding population of cynomolgus monkey in Eastern China. *Laboratory Animal Science*, **2**(4): 34-37. [刘仕刚, 谢亮. 2012. 华东地区人工饲养食蟹猴血液常规和血清生化值的测定. 实验动物科学, **2**(4): 34-37.]

Macellini S, Ferrari PF, Bonini L, Fogassi L, Paukner A. 2010. A modified mark test for own-body recognition in pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*). *Animal Cognition*, **13**(4): 631-639.

Malaivijitnond S, Arsaithamkul V, Tanaka H, Pomchote P, Jaroenporn S, Suryobroto B, Hamada Y. 2012. Boundary zone between northern and southern pig-tailed macaques and their morphological differences. *Primates*, **53**(4): 377-389.

Moss JA, Malone AM, Smith TJ, Butkyavichene I, Cortez C, Gilman J, Kennedy S, Kopin E, Nguyen C, Sinha P, Hendry RM, Guenthner P, Holder A, Martin A, McNicholl J, Mitchell J, Pau CP, Srinivasan P, Smith JM, Baum MM. 2012. Safety and pharmacokinetics of intravaginal rings delivering tenofovir in pig-tailed macaques. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11): 5952-5960.

Newman RM, Hall L, Kirmaier A, Pozzi LA, Pery E, Farzan M, O'Neil SP, Johnson W. 2008. Evolution of a TRIM5-CypA splice isoform in old world monkeys. *PLoS Pathogens*, **4**(2): e1000003.

Patton DL, Sweeney YT, Paul KJ. 2009. A summary of preclinical topical microbicide rectal safety and efficacy evaluations in a pigtailed macaque model. *Sexually Transmitted Diseases*, **36**(6): 350-356.

Reeves RK, Fultz PN. 2008. Characterization of plasmacytoid dendritic cells in bone marrow of pig-tailed macaques. *Clinical and Vaccine Immunology*, **15**(1): 35-41.

Schuurman HJ, Smith HT. 2005. Reference values for clinical chemistry and clinical hematology parameters in cynomolgus monkeys. *Xenotransplantation*, **12**(1): 72-75.

Smucny DA, Allison DB, Ingram DK, Roth GS, Kemnitz JW, Kohama SG, Lane MA, Black A. 2004. Changes in blood chemistry and hematology variables during aging in captive rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Journal of Medical Primatology*, **33**(1): 48-54.

Tosi AJ, Morales JC, Melnick DJ. 2000. Comparison of Y chromosome and mtDNA phylogenies leads to unique inferences of macaque evolutionary history. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **17**(2): 133-144.

Virgen CA, Kratovac Z, Bieniasz PD, Hatziioannou T. 2008. Independent genesis of chimeric TRIM5-cyclophilin proteins in two primate species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(9): 3563-3568.

Weed MR, Wilcox KM, Ator NA, Hienz RD. 2008. Consistent, high-level ethanol consumption in pig-tailed macaques via a multiple-session, limited-intake, oral self-dosing procedure. *Alcoholism: Clinical Experimental Research*, **32**(6): 942-951.

Wilson SJ, Webb BL, Ylinen LM, Verschoor E, Heeney JL, Towers GJ. 2008. Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(9): 3557-3562.

动 物 学 研 究 2013，Apr. 34(2): 97−102 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2013.02097

中国圈养食蟹猴 *TrimCyp* 基因频率

田 帅[#]，蒙裕欢[#]，柳明玉，孙 飞，陈军辉，杜红丽[*]，王小宁

华南理工大学 生物科学与工程学院，广州 510006

摘要： TRIM5α 在绝大部分的旧大陆猴中扮演抗逆转录病毒的角色，能够限制 HIV-1 的活性。*TRIMCyp* 融合基因是继 TRIM5α 后的另一个抗 HIV-1 因子研究热点。旧大陆猴的 *TRIMCyp* 融合基因是由 *CypA* 假基因 cDNA 序列以逆转录转座的方式插入至 *TRIM5* 基因的 3'非翻译区形成，而且 *TRIMCyp* 融合基因在不同灵长类动物中具有地域、基因频率、基因型以及抗逆转病毒效应的差异。虽然食蟹猴 *TRIMCyp* 基因的频率在东南亚几个国家或地区已经被初步调查，但是，中国大陆食蟹猴养殖场的 *TRIMCyp* 基因频率还没有明确阐明。该研究对中国 5 个省 11 个养殖场共 1 594 个食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 繁殖种群随机样本的 *TRIMCyp* 基因频率进行了筛查研究，发现各场频率略有差异，从 7.65%～19.79%不等，显著低于已报道的菲律宾、马来西亚和印度尼西亚来源食蟹猴的 *TRIMCyp* 基因频率 (34.85%~100%)。该原因可能是由于后者是建立于 1978 年的封闭群。对带有 *TRIMCyp* 融合基因的个体 CypA 测序发现带有 NE 单倍型的食蟹猴个体很少，NE 单倍型频率 (4.93%) 显著低于东南亚三个国家食蟹猴的 NE 单倍型频率 (11.1%～14.3%)纯合子。该研究为进一步开展食蟹猴 HIV-1 动物模型和发病机制提供了基础信息。

关键词： *TRIMCyp* 融合基因；HIV-1 动物模型；基因频率；多态性
中图分类号： Q343.1 **文献标志码：** A **文章编号：** 0254-5853-(2013)02-0097-06

TRIMCyp frequency of the cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) in captivity in China

Shuai TIAN [*], Yu-Huan MENG [*], Ming-Yu LIU, Fei SUN, Jun-Hui CHEN, Hong-Li DU [#], Xiao-Ning WANG

School of Bioscience & Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract: In most Old world monkey species, TRIM5α plays a role in combating retroviruses and restricting HIV-1. Alongside TRIM5α, the *TRIMCyp* fusion gene formed by the retrotransposition of a CypA pseudogene cDNA to 3' terminal or 3'-UTR of *TRIM5* gene in these monkeys has become a key research area in anti HIV-1 factors. The regional differences, gene frequencies, genotypes, and retrovirus restrictive activities of *TRIMCyp* vary among different primate species. While the frequencies of cynomolgus *TRIMCyp* have been studied in several areas of Southeast Asia, the frequency and prevalence of cynomolgus *TRIMCyp* in China remains unclear. In this study, we screened 1,594 cynomolgus samples from 11 monkey manufacturers located across 5 provinces in China. Our results showed that the frequencies of *TRIMCyp* range from 7.65% to 19.79%, markedly lower than the frequencies found in monkey species in the Philippines, Malaysia and Indonesia (ranging from 34.85% to 100%). We speculate that potentially the latter were isolated groups established since 1978. The NE haplotype frequencies of cynomolgus *TRIMCyp* were 4.93% in China, also significantly lower than those found in species in the Philippines, Malaysia and Indonesia (from 11.1% to 14.3%). Our research provides interesting findings that contribute towards a more firm basis of further studies of HIV-1 animal models and relevant pathogenesis.

Keywords: *TRIMCyp* fusion gene; HIV-1 animal model; gene frequency; Polymorphisms

TRIM5α 是 TRIM 蛋白家族的一员，由 *TRIM5* 初级转录产物经过可变剪切产生。人 TRIM5α 由 493

收稿日期：2012-12-05；接受日期：2013-01-07
基金项目：国家科技重点药物创新与开发重大项目(2011ZX09307-303-03)；广州省科学技术计划项目(2009A081000002，2010B060200007，2012B060300006)；中央高校基础研究基金(2012zz0091, 2012ZZ0093，2011ZM0111)
[*]通信作者(Corresponding author)，E-mail: hldu@scut.edu.cn
[#]共同第一作者(Authors contributed equally to the work)，田帅 (1988−)，男，硕士研究生，专业方向为生物化学与分子生物学，E-mail: tianshuai11scut@163.com；蒙裕欢 (1988−)，男，硕士研究生，专业方向为生物化学与分子生物学，E-mail:yuhuan-meng@163.com

个氨基酸组成，具有 RING、B-box2、coiled-coil 以及 C'末端的 B30.2/SPRY 等 4 个结构域。TRIM5α 蛋白作为逆转录病毒衣壳特异性的限制因子，具有抗 HIV-1 感染的作用，且由于它能够在病毒进入细胞后通过阻碍其反转录过程来限制病毒感染，故属于进入后限制作用 (Stremlau et al, 2004; Tang et al, 2009)。研究表明，TRIM5α 的病毒限制作用与各结构域的结构和功能紧密相关。RING 结构域具有 E3 泛素连接酶功能，能够促进 TRIM5α 自身泛素化，增强蛋白与蛋白之间的相互作用(Mische et al, 2005)。B-box2 结构域为抑制病毒逆转录所必须，与 TRIM5α 同源多聚体的相互作用有关 (Mische et al, 2005)，该区域在一定程度上能够通过调节 TRIM5α 高度有序的自我装配而增强对 HIV-1 的限制作用(Diaz-Griffero et al, 2009)。Coiled-coil 功能域对 TRIM5α 蛋白二聚体的形成和稳定有重要作用，只有 TRIM5α 同源二聚体才具有抗慢病毒的功能 (Stremlau et al, 2004)，且 coiled-coil 结构域也参与决定抗病毒特异性，对 TRIM5α 特异性识别和结合病毒衣壳有一定作用(Maillard et al, 2010)。SPRY/B30.2 结构域的 V1、V2 和 V3 三个可变区域对病毒衣壳特异性具有重要作用。B30.2 区域的这 3 个可变区域均可形成 Loop 结构，该结构有利于 TRIM5α 蛋白与病毒特异性识别与结合 (Ohkura et al, 2006)。该区域的 N 端部分对抗 HIV-1 有决定作用 (Yap et al, 2005)，C 末端 SPRY/B30.2 结构域是抗逆转录病毒所必需的，也是识别结合 HIV-1 衣壳必不可少的关键区域 (Lim et al, 2010)。在 HIV-1 感染靶细胞的早期阶段，细胞内的 TRIM5α 蛋白通过 B30.2 结构域与入侵的 HIV-1 衣壳蛋白相互作用，并且在 RING 结构域 E3 泛素连接酶的作用下，通过促进 HIV-1 脱壳或加速衣壳蛋白降解来阻碍反转录过程的顺利进行，从而抑制 HIV-1 后期逆转录产物的产生 (Stremlau et al, 2006)。

TRIMCyp 蛋白首先在鹰猴 (*Aotus trivirgatus*) 中被发现，鹰猴体内表达的一种融合蛋白 TRIMCyp 能够限制 HIV-1 感染。TRIMCyp 蛋白保留了 TRIM 蛋白家族 N 末端的 RBCC 三模序列，只是 TRIM5α 蛋白的 B30.2 结构域被亲环素 CypA (Cyclophilin A) 代替。在鹰猴中，*CypA* 基因通过逆转座作用插入 *TRIM5* 基因的第 7 和第 8 外显子之间，形成 *TRIM5-CypA* 融合基因，TRIMCyp 同样通过形成同源二聚体而发挥限制作用 (Nisole et al, 2004; Sayah et al, 2004)。鹰猴 TRIMCyp 以与其他灵长类 TRIM5α 相似的机制限制 HIV-1 感染，都能够在反转录病毒进入靶细胞后的早期阶段限制其感染。亲环蛋白 CypA 是一种肽基脯氨酰异构酶，能够结合 HIV-1 衣壳表面富含脯氨酸的回环结构，这种相互作用增加了人对 HIV-1 的易感性，同时也增强了非人类灵长类动物限制 HIV-1 的活性 (Sokolskaja & Luban, 2006)。TRIMCyp 除了在新大陆猴鹰猴体内被发现以外，也在旧大陆猴体内被发现，至少 4 种猴子体内有 TRIMCyp 融合蛋白：印度恒河猴 (*Macaca mulatta*)、平顶猴 (*Macaca nemestrina*)、熊猴 (*Macaca assamensis*) 以及食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)(Brennan et al, 2008; Cao et al, 2011; Liao et al, 2007; Newman et al, 2008; Virgen et al, 2008; Wilson et al, 2008)，这些融合基因均由 *CypA* 基因通过 L1 介导的逆转座作用插入 *TRIM5* 基因的 3'UTR 而形成,它们均能经转录和翻译产生由 *TRIM5α* 的 2～6 号外显子和完整 CypA 结构域组成的 TRIMCyp 蛋白。恒河猴和平顶猴的 TRIMCyp 不能限制 HIV-1 感染，却能够限制 HIV-2 和 FIV 的活性(Brennan et al, 2008; Liao et al, 2007; Newman et al, 2008; Virgen et al, 2008; Wilson et al, 2008)。最新研究表明，食蟹猴中的 TRIMCyp 多态性具有功能差异 (Dietrich et al, 2011)，TRIMCyp 主要单体型(DK)即 TRIMCyp 融合蛋白 CypA 结构域中的第 66 位天冬氨酸(D)和第 143 位赖氨酸(K)可限制 HIV-1 的作用，但不能限制 HIV-2。TRIMCyp 次要单体型(NE)即 TRIMCyp 融合蛋白 CypA 结构域中的第 66 位天冬酰胺(N)和第 143 位谷氨酸(E)能够限制 HIV-2，却不能限制 HIV-1 感染 (Saito et al, 2012a)，两种单体型功能完全相反，提示 TRIMCyp 的多态性对抗病毒效应有一定的影响，因此携带 TRIMCyp NE 单体型的食蟹猴有可能构建成为 HIV-1 感染的动物模型。

TRIMCyp 的等位基因频率存在地域偏差，虽然食蟹猴 *TRIMCyp* 基因的频率在东南亚不同国家或地区已经被初步调查 (Berry et al, 2012; Dietrich et al, 2011; Saito et al, 2012a; Saito et al, 2012b)(表 1)，但是，中国大陆食蟹猴养殖场的 *TRIMCyp* 基因频率还未被明确阐明，本研究对中国 5 个省 11 个养殖场共 1 594 个食蟹猴繁殖种群随机样本中的 *TRIMCyp* 基因频率进行了筛查研究，以期为进一步开展食蟹猴 HIV-1 动物模型和 HIV-1 发病机制研究

表 1　东南亚不同地区食蟹猴 *TRIMCyp* 等位基因频率
Table 1　Frequency of *TRIMCyp* alleles of cynomolgus macaques in Southeast Asia

来源 Origin	食蟹猴数量 No. of animals	基因型(动物数量) Genotype (no. of animals)			基因频率(%) Allele frequency (%)		引文 Citation
		TRIM5α	*TRIM5α/TRIMCyp*	*TRIMCyp*	*TRIM5α*	*TRIMCyp*	
Indonesia	18	3	10	5	44.44	55.56	Dietrich et al, 2011
Indonesia	33	13	17	3	65.15	34.85	Saito et al, 2012a
Indonesia	58	12	37	9	52.59	47.41	Berry et al, 2012
Indonesia	10	7	3	0	85.00	15.00	Saito et al, 2012b
Indochina	14	10	4	0	85.71	14.29	Dietrich et al, 2011
Mauritius	44	44	0	0	100	0	Dietrich et al, 2011
Mauritius	47	47	0	0	100	0	Berry et al, 2012
Philippines	4	0	0	4	0	100	Dietrich et al, 2011
Philippines	46	1	10	35	13.04	86.96	Saito et al, 2012a
Philippines	49	3	11	35	17.35	82.65	Saito et al, 2012b
Malaysia	47	11	26	10	51.06	48.94	Saito et al, 2012a
Malaysia	29	11	8	10	51.72	48.28	Saito et al, 2012b

奠定基础。

1　材料与方法

1.1　样品来源与 DNA 抽提

本研究在广东、广西、云南、海南和江苏 5 个省 11 个养殖场的食蟹猴繁殖种群中随机采集了 1 594 个血样，EDTA 抗凝于-20 ℃保存备用。基因组 DNA 抽提试剂盒购自北京普博生物科技有限公司，按照说明书进行基因组 DNA 提取。

1.2　引物设计与合成

分别根据 *TRIM5α* 第 8 外显子和 3'UTR 序列设计 *CypA* 筛查引物，引物为 TrimcypF: ATGACTCTGTGCTCACCAAG，TrimcypR：AACTCTAGTCACCCTACTATG，由上海生工生物公司合成。

1.3　PCR 扩增及测序

以基因组 DNA 为模板，通过 PCR 扩增筛查 *CypA* 插入情况，并对带有 *CypA* 个体进行测序。PCR 扩增所用 Taq 酶为 TaKaRa LA Taq 酶(宝生物工程(大连)有限公司)。反应条件为：94 ℃ 5 min；94 ℃ 40 s，退火温度 59 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min，35 个循环；72 ℃ 5 min。*CypA* 插入片段的测序验证：回收 1 000 bp 和 1 700 bp 的 PCR 产物凝胶，送交深圳华大基因科技有限公司 (广州)进行上、下游引物测序。

2　结　果

2.1　PCR 和测序

PCR 扩增结果见图 1，PCR 产物凝胶回收后的上、下游引物测序结果与预期序列一致。

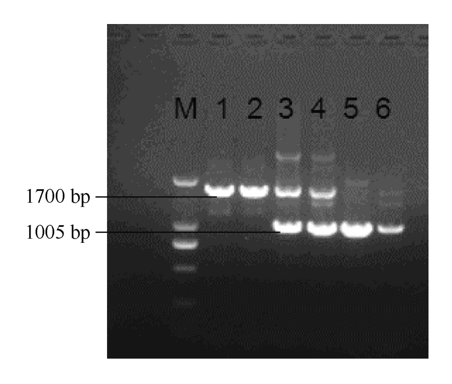


图 1　PCR 产物电泳情况
Figure 1　Electrophoresis image of PCR product

M：为 DNA Marker 2000；样品 1 和 2：CypA 插入纯合子；3 和 4：CypA 插入杂合子；5 和 6：无 CypA 插入阴性纯合子。
M: DNA Marker 2000; Sample 1 and 2: CypA insertion homozygote; Sample 3 and 4: CypA insertion heterozygote; Sample 5 and 6: homozygote without CypA insertion.

2.2　基因分型和等位基因频率

从 5 个省 11 个养殖场共 1594 个食蟹猴样本统计来看，共有 379 个个体含有 *TRIMCyp* 融合基因，占总数的 23.78%，其中纯合子 47 个(12.40%)，杂合子 332 个(87.60%)。*TRIM5α* 和 *TRIMCyp* 基因频率具体结果见表 2。在我们筛查的中国圈养食蟹猴中，*TRIM5α* 基因频率显著高于 *TRIMCyp* 融合基因频率，分别是 86.64%和 13.36%；*TRIMCyp* 融合基因频率(7.65%~19.79%)高于毛里裘斯食蟹猴的 *TRIMCyp* 融合基因频率(0%)，显著低于印度尼西亚、菲律宾和马来西亚各国的 *TRIMCyp* 融合基因

表 2　中国圈养食蟹猴 *TRIM5α* 与 *TRIMCyp* 基因频率统计
Table 2　Frequencies of cynomolgus *TRIM5 alpha* and *TRIMCyp* genes in China

来源 Origin	食蟹猴数量 No. of animals	基因型食蟹猴数目 Genotype (no. of animals)			等位基因频率(%) Allele frequency (%)	
		TRIM5α	TRIM5α/TRIMCyp	TRIMCyp	TRIM5α	TRIMCyp
广东 1 Guangdong 1	85	74	9	2	92.35	7.65
广东 2 Guangdong 2	560	407	132	21	84.46	15.54
广东 3 Guangdong 3	50	37	11	2	85.00	15.00
广东 4 Guangdong 4	569	450	102	17	88.05	11.95
广西 1 Guangxi 1	49	37	12	0	87.76	12.24
广西 2 Guangdong 2	29	19	9	1	81.03	18.97
云南 1 Yunnan 1	48	31	15	2	80.21	19.79
云南 2 Yunnan 2	75	54	21	0	86.00	14.00
海南 1 Hainan 1	50	42	7	1	91.00	9.00
海南 2 Hainan 2	30	24	6	0	90.00	10.00
江苏 Jiangsu	49	40	8	1	90.82	9.18
总计/Total	1594	1215	332	47	86.64	13.36

频率(34.85%~100%)，而与印度尼西亚 (Saito et al, 2012b)和中印半岛食蟹猴 *TRIMCyp* 融合基因频率无明显差异(表 1)。

2.3　*TRIMCyp* 单倍型统计

将含有 *TRIMCyp* 融合基因的个体进行 *CypA* 测序，并对 CypA 第 66 位氨基酸(D/N)和 143 位氨基酸(K/E)的个体进行统计，结果显示 NE 单倍型食蟹猴个体很少，仅 20 个个体，其中只有一个是 NE 单倍型纯合子(表 3)，且中国圈养食蟹猴 NE 单倍型频率 (4.93%)也显著低于东南亚三个国家食蟹猴 NE 单倍型频率 (11.1%～14.3%)(Saito et al, 2012a)。

表 3　中国圈养食蟹猴 *TRIMCyp* DK 和 NE 单倍型频率
Table 3　Frequencies of cynomolgus *TRIMCyp* haplotypes DK&NE in China

单倍型 Haplotype	*TRIM5a/TRIMCyp* 杂合子 *TRIM5a/TRIMCyp* heterozygote	*TRIMCyp* 纯合子 *TRIMCyp* homozygote	频率(%) Frequency (%)	
			DK	NE
TRIMCyp (DK)	319	40		
TRIMCyp (NE)	13	1	95.07	4.93
TRIMCyp (DK/NE)	—	6		
总计/Total	332	47		

3　讨　论

本研究初步筛查了我国境内食蟹猴 *TRIMCyp* 融合基因和 *CypA* 单倍型的频率，而对食蟹猴 *TRIMCyp* 融合基因对不同逆转录病毒的抗毒效应未进一步研究。灵长类动物 *TRIMCyp* 融合基因从发现至今，研究者除了对新大陆猴鹰猴 TRIMCyp 融合蛋白限制 HIV-1 复制的作用机制有一定了解以外，旧大陆猴 TRIMCyp 融合蛋白不能限制 HIV-1 感染的具体机制到现在还没有确切结论。最近发现 *Cyp*A 上几个位点的多态性会影响 TRIMCyp 融合蛋白的限制逆转录病毒活性，其中 CypA 结构域中第 54 位氨基酸的单点突变(H54R)决定了食蟹猴 TRIMCyp 融合蛋白限制 HIV-1 和 FIV 的能力 (Ylinen et al, 2010)。进一步研究除证实了该结论以外，还发现 TRIMCyp 融合蛋白 CypA 结构域中的第 66 位和 143 位氨基酸与印度尼西亚食蟹猴 TRIMCyp 融合蛋白的限制逆转录病毒活性密切相关，其中 66 位为 D，143 位为 K 的突变能够限制 HIV-1 复制 (Dietrich et al, 2011)。由于不同灵长类动物来源的 TRIMCyp 融合蛋白在其 CypA 结构域中的许多氨基酸位点存在差异，导致其 TRIMCyp 融合蛋白与不同逆转录病毒衣壳蛋白 Gag 的识别和结合能力也存在差异，继而导致其抑制活性上的差异 (Cao et al, 2012)。在我国境内含 *TRIMCyp* 融合基因的食蟹猴，绝大部分是以 *TRIM5α/TRIMCyp* 杂合子的形式出现 (87.60%)，在东南亚不同国家或地

区的 *TRIM5α/TRIMCyp* 杂合子频率是 53.16%；而 *TRIMCyp* 的基因频率甚至高达 100%(Philippines)，远远高于中国圈养的平均水平 (13.36%)。原因可能是由于前者是建立于 1978 年的封闭群。同时，Saito et al (2012a)对印度尼西亚食蟹猴的两次研究显示不同的 *TRIMCyp* 融合基因频率 (15.00%和 34.85%)，而在毛里裘斯食蟹猴中则未发现 *TRIMCyp* 融合基因。另外，我们发现在中国圈养的 NE 单倍型食蟹猴个体极少，NE 单倍型频率(4.93%)也显著低于东南亚三个国家的食蟹猴 NE 单倍型频率 (11.1%～14.3%)。因此，如果需要构建中国圈养食蟹猴 HIV-1 感染模型的资源群，需要大量筛查中国圈养携带 *TRIMCyp* 融合基因的食蟹猴，并根据 *TRIMCyp* 单倍型来构建封闭群。另外，研究 *TRIMCyp* 不同单倍型与 HIV-1 和 HIV-2 感染的相关性，有助于进一步揭示 HIV 的感染机制。*TRIMCyp* 融合基因的发现和研究为 HIV-1 研究提供策略基础，为探讨 *TRIMCyp* 与其他抗 HIV-1 固有免疫分子的相互关系提供新思路，并为建立更理想的 HIV-1/AIDS 动物模型提供科学依据。

参考文献：

Berry NJ, Marzetta F, Towers GJ, Rose NJ. 2012. Diversity of TRIM5α and TRIMcyp sequences in cynomolgus macaques from different geographical origins. *Immunogenetics,* **64**(4): 267-278.

Brennan G, Kozyrev Y, Hu SL. 2008. TRIMcyp expression in old world primates macaca nemestrina and macaca fascicularis. *Proceedings of the Natlional Academy of Sciences of the United States of America,* **105**(9): 3569-3574.

Cao G, Liu FL, Zhang GH, Zheng YT. 2012. The primate TRIMcyp fusion genes and mechanism of restricting retroviruses replication. *Zoological Research,* **33**(1): 99-107. [曹光, 刘丰亮, 张高红, 郑永唐. 2012. 灵长类动物 TRIMCyp 融合基因模式及对逆转录病毒复制的限制作用. 动物学研究, **33**(1): 99-107.]

Cao G, Nie WH, Liu FL, Kuang YQ, Wang JH, Su WT, Zheng YT. 2011. Identification of the TRIM5/TRIMcyp heterozygous genotype in macaca assamensis. *Zoological Research,* **32**(1): 40-49. [曹光, 佴文惠, 刘丰亮, 况轶群, 王金焕, 苏伟婷, 郑永唐. 2011. 熊猴存在TRIM45/TRIMCyp杂合子基因型. 动物学研究, **32**(1): 40-49.]

Diaz-Griffero F, Qin XR, Hayashi F, Kigawa T, Finzi A, Sarnak Z, Lienlaf M, Yokoyama S, Sodroski J. 2009. A b-box 2 surface patch important for trim5alpha self-association, capsid binding avidity, and retrovirus restriction. *Journal of Virology,* **83**(20): 10737-10751.

Dietrich EA, Brennan G, Ferguson B, Wiseman RW, O'Connor D, Hu SL. 2011. Variable prevalence and functional diversity of the antiretroviral restriction factor trimcyp in macaca fascicularis. *Journal of Virology,* **85**(19): 9956-9963.

Liao CH, Kuang YQ, Liu HL, Zheng YT, Su B. 2007. A novel fusion gene, trim5-cyclophilin a in the pig-tailed macaque determines its susceptibility to hiv-1 infection. *AIDS*, 21(Suppl 8): S19-S26.

Lim SY, Chan T, Gelman RS, Whitney JB, O'Brien KL, Barouch DH, Goldstein DB, Haynes BF, Letvin NL. 2010. Contributions of *Mamu- A*01* status and *TRIM 5* allele expression, but not *CCL3L* copy number variation, to the control of sivmac251 replication in indian-origin rhesus monkeys. *PLoS Genet,* **6**(6): e1000997.

Maillard PV, Ecco G, Ortiz M, Trono D. 2010. The specificity of TRIM5 alpha-mediated restriction is influenced by its coiled-coil domain. *Journal of Virology,* **84**(11): 5790-5801.

Mische CC, Javanbakht H, Song B, Diaz-Griffero F, Stremlau M, Strack B, Si Z, Sodroski J. 2005. Retroviral restriction factor TRIM5alpha is a trimer. *Journal of Virology,* **79**(22): 14446-14450.

Newman RM, Hall L, Kirmaier A, Pozzi LA, Pery E, Farzan M, O'Neil SP, Johnson W. 2008. Evolution of a TRIM5-cypa splice isoform in old world monkeys. *PLoS Pathog,* **4**(2): e1000003.

Nisole S, Lynch C, Stoye JP, Yap MW. 2004. A TRIM5-cyclophilin a fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict hiv-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **101**(36): 13324-13328.

Ohkura S, Yap MW, Sheldon T, Stoye JP. 2006. All three variable regions of the TRIM5alpha b30.2 domain can contribute to the specificity of retrovirus restriction. *Journal of Virology,* **80**(17): 8554-8565.

Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE. 2012a. Geographical, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor trimcyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology,* **93**(Pt 3): 594-602.

Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H. 2012b. Allele frequency of antiretroviral host factor trimcyp in wild-caught cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology,* 3: 314.

Sayah DM, Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J. 2004. Cyclophilin a retrotransposition into trim5 explains owl monkey resistance to hiv-1. *Nature,* **430**(6999): 569-573.

Sokolskaja E, Luban J. 2006. Cyclophilin, TRIM5, and innate immunity to hiv-1. *Current Opinion Microbiology,* **9**(4): 404-408.

Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. 2004. The cytoplasmic body component trim5alpha restricts hiv-1 infection in old world monkeys. *Nature,* **427**(6977): 848-853.

Stremlau M, Perron M, Lee M, Li Y, Song B, Javanbakht H, Diaz-Griffero F, Anderson DJ, Sundquist WI, Sodroski J. 2006. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the trim5alpha restriction factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America,* **103**(14): 5514-5519.

Tang X, Kuang YQ, Zheng YT. 2009. Research advance of TRIM5 α on structure and restriction mechanism to hiv-1 replication. *Chinese Journal of*

Virology, **25**(2): 148-153. [汤霞, 况轶群, 郑永唐. 2009. TRIM5α 分子结构和限制 HIV-1 复制机制的研究进展. 病毒学报, **25**(2): 148-153.]

Virgen CA, Kratovac Z, Bieniasz PD, Hatziioannou T. 2008. Independent genesis of chimeric TRIM5-cyclophilin proteins in two primate species. *Proceedings of the National Academy of the Scienes of the United States of America*, **105**(9): 3563-3568.

Wilson SJ, Webb BL, Ylinen LM, Verschoor E, Heeney JL, Towers GJ. 2008. Independent evolution of an antiviral trimcyp in rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of American*, **105**(9): 3557-3562.

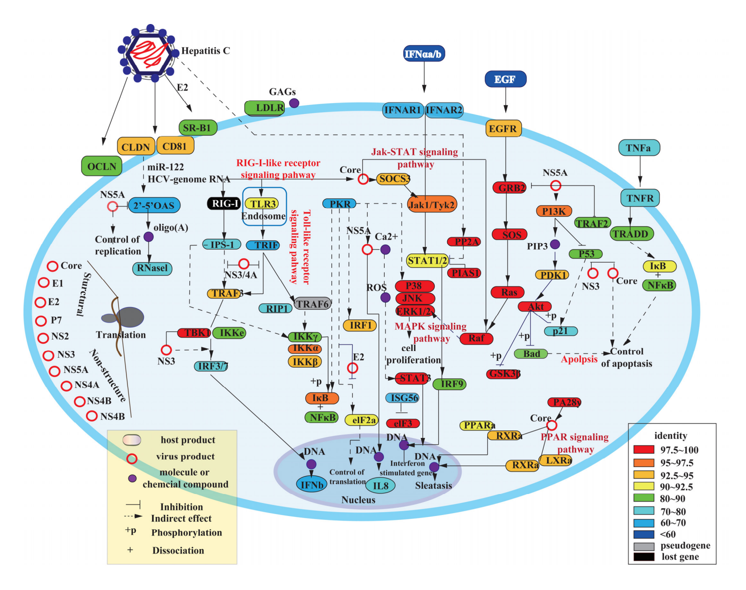
Yap MW, Nisole S, Stoye JP. 2005. A single amino acid change in the spry domain of human Trim5alpha leads to hiv-1 restriction. *Current Bioloinggy*, **15**(1): 73-78.

Ylinen LMJ, Price AJ, Rasaiyaah J, Hué S, Rose NJ, Marzetta F, James LC, Towers GJ. 2010. Conformational adaptation of asian macaque trimcyp directs lineage specific antiviral activity. *PLoS Pathog*, **6**(8): e1001062.

（上接第 ii 页）

乙肝和丙肝是重大的传染病。很多报道表明人类乙肝病毒和丙肝病毒能够感染树鼩，因此树鼩也常被用于 HBV 和 HCV 病毒感染的动物模型研究。通过对树鼩的免疫系统相关基因进行研究，发现与乙肝及丙肝病毒感染相关的基因，在人类和树鼩中具有高度一致性，但树鼩基因组中出现了 DDX58 基因的缺失。DDX58 基因在 NF-kB 通路的激活中具有重要作用，可产生针对病毒的干扰素。推测该基因功能的缺失可能与树鼩的易感有关。乙肝病毒是双链 DNA 病毒，也是一种反转录病毒，其反转录过程通过病毒自身的 DNA 聚合酶进行。TRIM5 是一种宿主限制性因子，能够阻止反转录的进行，在人类基因组中与其他几个基因形成基因簇，能够抑制 HBV 的活性。而在树鼩基因组中，该基因存在 5 个串联重复拷贝，其中一个具有 CypA 逆转录转座插入，形成了 TrimCyp 嵌合转录体，这种现象仅发生在少数灵长类中，在限制逆转录病毒活性中具有重要意义。

此外，研究人员还对树鼩基因组中的药物作用靶点基因进行了研究，例如细胞色素 P450 超家族能够编码一些与药物代谢、活化和相互作用相关的一些酶。树鼩拥有与人类非常接近的细胞色素 P450 超家族的组成结构和基因一致性。研究人员对人类和树鼩的肝炎药物靶点基因进行研究后发现二者同源度很高。这种药物靶点以及相关信号通路的保守性，使得树鼩更好的用于评价用于药物分布、药物靶点、药代动力学以及药物副作用研究。



该工作得到中科院、科技部和云南省的支持。原文链接 http://www.nature.com/ncomms/journal/v4/n2/full/ncomms2416.html

动　物　学　研　究　2013，Apr. 34(2): 103−107　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　DOI：10.3724/SP.J.1141.2013.02103

用弥散张量成像检测猕猴大脑运动区占位病变对健侧皮质脊髓束的作用

李经辉[1]，马芳州[1]，王载忠[1]，鲁　毅[2]，吴海鹰[3]，孙学进[2,*]，余化霖[1,*]

1. 昆明医科大学第一附属医院 神经外二科, 云南 昆明 650032；
2. 昆明医科大学第一附属医院 放射科，云南 昆明 650032；
3. 昆明医科大学第一附属医院 急诊科，云南 昆明 650032

摘要：因皮质脊髓束 (corticospinal tract , CST) 损伤而造成的运动功能丧失可得到一定恢复，但关于大脑运动区占位性病变对健侧 CST 结构功能影响的研究却相对较少。该研究采用两只健康猕猴行球囊置入术建立大脑运动区占位性病变模型，行 4 次磁共振弥散张量成像 (diffusion tensor imaging，DTI) 扫描，检测手术区对侧 CST 的 FA 值（“各向异性”值), 发现球囊置入术后当天，对侧 CST 的 FA 值无明显变化，但随时间的延长升高，球囊取出术后一周更为明显。实验表明该模型可行、可靠，从 DTI 观察到病变健侧 CST 出现代偿，即使占位解除短期内这一作用仍明显，提示健侧 CST 共同参与瘫痪肢体功能的恢复。

关键词：猕猴；大脑运动区占位病变模型；皮质脊髓束；弥散张量成像
中图分类号：Q959.848　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2013)02-0103-05

A DTI study of the contralateral corticospinal tract modeled through simulated intracranial space-occupying lesions in macaque brain motor areas

Jing-Hui LI[1], Fang-Zhou MA [1], Zai-Zhong WANG[1], Yi LU[2], Hai-Ying WU[3], Xue-Jin SUN[2,*], Hua-Lin YU[1,*]

1. *First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Second Department of Neurosurgery, Kunming* 650032, *China*；
2. *First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Department of Radiology, Kunming* 650032, *China*；
3. *First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Department of Emergency, Kunming* 650032, *China*

Abstract: Recent studies found that a loss of motor function following corticospinal tract (CST) damage can, to some extent, be restored. Few studies, however, examine how space-occupying lesions in the brain motor area may affect the contralateral CTS structure and function. We performed a simulation of intracranial space-occupying lesions in the brain motor area by implanting of balloons into the brains of the two healthy macaques. Diffusion tensor imaging (DTI) was performed on the macaques' brains four times to measure the FA values of the contralateral CST operative area. The results showed that on the day of balloon implantation, the FA values had no obvious effect, but with time the effect increased, becoming increasingly apparent one week after removing the balloons. Experimental results demonstrated that this model was both feasible and reliable. After the simulated space-occupying lesions occurred in the brain motor area, DTI showed a compensatory response of the contralateral CTS, which remained for a short period of time even after the lesions were removed. This result suggests that the contralateral CST may then also contribute to recovery of limb function.

Keywords: Macaque; Simulation model of intracranial space-occupying lesions; Corticospinal tract; Diffusion tensor imaging

颅内占位性病变是中枢神经系统常见疾病，如肿瘤、血肿及炎症等，位于大脑运动功能区及其附近的占位性病变，可造成肢体瘫痪、颅内高压等临床症状。目前，手术切除病变仍是常用治疗手段，

收稿日期：2012-10-15；接受日期：2013-03-05
基金项目：云南省联合基金项目 (2008CD006)
*通信作者(Corresponding authors)，E-mail: yuhl308@126.com；sunxuejinkm@126.com
第一作者简介：李经辉, 昆明医科大学第一附属医院神经外二科, 昆明医科大学在读博士研究生, E-mail: km_ljh@126.com

但手术风险大，易发生较严重的并发症，造成永久性肢体功能丧失。

大脑半球额叶运动区皮质锥体细胞及其轴突组成的皮质脊髓束 (corticospinal tract，CST)是控制肢体运动的直接中枢神经结构，是中枢神经系统最大的下行白质束，主要起自额叶的中央前回皮质。CST 主要支配肢体远端的肌肉，控制骨骼肌的随意运动，特别是细微的主动运动 (Susan, 2005)，如绣花等。CST 损伤造成的功能丧失可以部分恢复 (Meintzschel & Ziemann, 2006; Dong, 2006)，但由于人体大脑运动功能区占位性病变的不可预知性，故无法准确追踪病情发展过程、开展实验性检查和创新性治疗以及准确选择条件相同的样本，因此，建立能够模拟人脑功能区占位性病变发病机制及病理过程和临床转归一致的动物模型是开展相关研究的前提。猕猴在进化地位、生理学、解剖学、遗传学、系统发育学等方面与人类非常相近 (Kuai et al, 2009)，且其基因组也已得到破译 (Liao & Su, 2012)，是适用于大脑运动功能区占位性病变研究的模型动物。

颅内大脑运动区占位病变以压迫推挤白质纤维束所致的对侧肢体功能障碍为主要临床表现，临床以手术摘除病灶，解除压迫为目的。因此，本研究在猕猴脑运动区表面建立逐渐扩大的球型占位模型压迫推挤 CST 以致对侧肢体瘫痪，1 周后取出球囊，模拟临床发病过程。自由水的随机扩散在不同方向上程度相同，即所谓“各向同性”，而不同组织器官中各异的水含量可导致水分子在不同方向上扩散的不一致，且这种不一致可通过计算得到客观指标并得以量化。基于此原理，无创性磁共振弥散张量成像 (diffusion tensor imaging，DTI) 技术能够在活体脑组织中显示白质纤维束的走行、排列、方向、紧密度和髓鞘化以及细胞的完整性和病理变化等 (Le et al, 2003; Eriksson et al, 2001)。在中枢神经系统中，由于轴突膜和髓鞘将阻碍水分子在垂直于神经纤维走向上的扩散，即部分“各向异性” (fractional anisotropy, FA) (Beaulieu & Allen,1994)，而脑白质纤维束总是向同一方向走行，水分子的水平方向扩散速度明显快于垂直方向。FA 值的大小主要与髓鞘的完整性、纤维致密性及平行性等有关 (Chenevert et al,1990)，数值在 0～1 之间，1 为最大各向异性，0 为最小各向异性。由于脑白质有大量的纤维传导束，其表面包绕的髓鞘及少突胶质细胞等将阻碍水分子的扩散， FA 值升高，影像上呈高信号，说明神经传导功能越强 (Barrick & Clark, 2004; Klose et al, 2004)。脑脊液呈液态，比重为 1，其中水分子几乎可自由活动，FA 值很低，影像上呈低信号。目前 DTI 研究多集中在脑梗塞、出血及肿瘤等病变与同侧脑白质区纤维束变化的关系（Yu et al, 2009)，而对大脑运动区占位性病变手术前后与健侧 CST 的相关性研究很少。

本研究旨在建立能够模拟临床大脑运动区占位性病变的猕猴动物模型，应用 DTI 探讨大脑运动区占位性病变所造成的对侧肢体运动障碍，监测手术前后病变对侧 CST 的 FA 值动态变化过程，并了解健侧 CST 是否也参与瘫痪肢体功能的恢复。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康猕猴两只，5 a 龄，一号猴体重 7.1 kg、二号猴体重 7.8 kg，饲养于中国科学院昆明动物研究所实验动物中心，动物饲养及实验经实验动物使用和伦理委员会批准并符合 AAALAC 规范。

1.2 实验方法

1.2.1 猕猴大脑中央前回占位病变模型的制备及护理

实验猕猴术前禁食 12 h，禁水 6 h。常规肌注麻醉 (0.4 mg/kg 阿托品，15 mg/kg 氯胺酮，15～30 mg/kg 戊巴比妥) 后俯卧位固定；猕猴立体定向头架固定头颅并保持气道通畅，根据猕猴脑定位图谱确定左侧皮质中央前回运动区为手术区域；备皮、消毒后行弧形切口，依次切开皮肤、皮下组织、帽状腱膜及骨膜，显露颅骨，钻孔两个，铣刀铣出 2×3 cm^2 的骨窗；小心剪开 1 cm 硬脑膜，将未注水球囊慢慢送入硬膜下中央前回脑表面，吸取生理盐水 1.5 mL，每 5 min 注射 0.5 mL 入球囊，注射完毕后将球囊远端结扎，严密缝合硬脑膜，回纳骨瓣，分层缝合切口；术后右侧卧位，待其自然苏醒。术后 4 h，猕猴意识清醒并且活跃，给予食物及饮水。

1.2.2 猕猴运动区球囊取出术

麻醉、备皮及消毒后 (方法同前)，依次剪开切口各层组织缝线，用注射器小心缓慢抽出球囊中的水，待其收缩完全后缓慢取出球囊，仔细止血后严密缝合切口。

1.2.3 模型评价指标

麻醉苏醒后的猕猴出现对侧肢体功能障碍。参

照 Glasgow 评分 (Teasdale & Jennett,1974), 制定功能评分表，0 分：正常；1 分：对侧前后肢不能完全伸直；2 分：行走时向对侧 (右) 倾抖；3 分：行走时身体向对侧 (右) 倾倒；4 分：不能站立和自发行走，意识障碍。动物麻醉清醒后观察神经功能缺失情况，≥3 分者符合研究实验条件。

MRI 检查球囊位于左侧中央沟前份硬膜下，中线向右侧移位。

1.3　DTI 检查

每只猕猴行四次 DTI 检查 (Achieva 3.0T 超导核磁共振扫描仪，荷兰 PHILIPS 公司)。第 1 次：手术前 1 d (Before 组)；第 2 次：球囊置入术当天 (Just 组)；第 3 次：球囊置入术后 7 d (球囊取出术前 1 d (Remove 组)；第 4 次：第一次术后 14 d (球囊取出术后 7 d (Recover 组)。给予标准膝关节线圈扫描、磁共振 MP-RAGE 及 DT-MRI 扫描，且每次 DTI 序列均连续扫描 12 次。采集图像数据经后处理，给予变形纠正与配准校正。

处理后每个层面获得 FA 值平均图，选取健侧 CST 为感兴趣区 (regions of interest, ROI)，测量 FA 值。ROI 以双侧对称且小于解剖结构大小为标准，避免邻近组织的影响。

1.4　统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行相关统计学分析，计量资料数据以 mean±*SD* 表示， 两组间差异采用秩和检验及非参数检验，秩次方差分析方法进行统计学处理，$P<0.05$ 差异显著。

2　结　果

2.1　猕猴术后对侧肢体功能评分比较

两只猕猴术后对侧肢体均出现功能障碍 (表 1，表 2)，术后对侧肢体活动评分无差异 ($P>0.05$)；同侧肢体功能未受影响，各时间段评分均为 0 分，与对侧肢体功能评分行秩和检验，$P<0.05$ 提示术后对侧肢体活动较同侧差；球囊置入术后与取出术后对侧肢体功能评分行秩和检验，一号猴 $P<0.05$，二号猴 $P<0.05$，提示两只猕猴的对侧肢体活动功能在球囊取出术后较置入术后有所恢复。

2.2　四次 DTI 检查手术区对侧 CST 的 FA 值统计学分析

一号猴 DTI 检查手术区对侧 CST (图 1)FA 值行非参数检验秩次方差分析，可见秩次在四组间差异

表 1　猕猴球囊置入术后对侧肢体功能评分表

Table 1　Contralateral limb function in macaques after balloon implantation

术后 Post-operation	当天 Same day	1 天 1d	2 天 2d	3 天 3d	4 天 4d	5 天 5d	6 天 6d	7 天 7d
一号猴 Macaque 1	4	3	3	3	3	3	2	2
二号猴 Macaque 2	3	3	3	3	3	2	2	2

$Z=-0.617$，渐进显著性 (双侧) $P=0.537$，精确显著性 (单侧显著性)$P=0.721$，$P>0.05$。

$Z=-0.617$，Asymp.sig. (2-tailed) $P=0.537$，Exact sig [2*(1-tailed sig.)] $P=0.721$, $P>0.05$.

表 2 猕猴球囊取出术后对侧肢体功能评分表

Table 2　Contralateral limb function in macaques after balloon removal

术后 Post-operation	当天 Same day	1 天 1d	2 天 2d	3 天 3d	4 天 4d	5 天 5d	6 天 6d	7 天 7d
一号猴 Macaque 1	2	2	2	2	2	1	1	1
二号猴 Macaque 2	2	2	2	2	1	1	1	0

$Z=-0.657$，渐进显著性(双侧) $P=0.511$，精确显著性(单侧显著性)$P=0.574$，$P>0.05$。

$Z=-0.657$，Asymp.sig (2-tailed) $P=0.511$，Exact sig [2*(1-tailed sig.)] $P=0.574$, $P>0.05$.

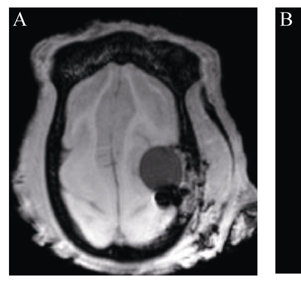
表 3　两只猕猴四次 DTI 的 FA 值 (mean±*SD*)

Table 3　FA values of 4 DTI on two macaques (mean±*SD*)

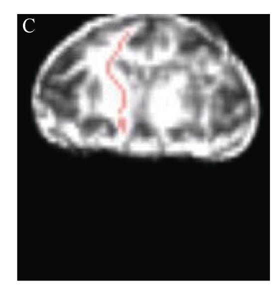
	术前 Before (before operation)	术后当天 Just (day of operation)	球囊取出前 1 天 Remove (day before balloon removal)	球囊取出术后一周 Recover (7 days after balloon removal)
一号猴 Macaque 1	0.3570±0,0038	0.3588±0.0089	0.3651±0.0076	0.3991±0.0059
二号猴 Macaque 2	0.4974±0.0095	0.4985±0.0227	0.5028±0.0064	0.5344±0.0056

显著 (F=20.679，P=0.000，P<0.05)，使用 LSD 法进行 4 组间两两比较，Before 组与 Just、Remove 及 Recover 组的比较 P 值分别为 0.386、0.003 及 0.000；Just 组与 Remove、Recover 组的比较 P 值分别为 0.031、0.000；Remove 组与 Recover 组的比较 P 值为 0.000。说明球囊置入术后当天，对侧 CST 的 FA 值无明显变化，但随着时间的延长而升高，于球囊取出术后一周更为明显。

二号猴 DTI 检查手术区对侧 CST (图 2) FA 值行非参数检验秩次方差分析，可见秩次在 4 组间差异显著 (F=20.815，P=0.000，P<0.05),使用 LSD 法进行 4 组间两两比较， Before 组与 Just、Remove 及 Recover 的比较 P 值分别为 0.288、0.126 及 0.000；Just 组与 Remove、Recover 组的比较 P 值分别为 0.632、0.000；Remove 组与 Recover 组的比较 P 值为 0.000。说明球囊置入术后当天及取出术前当天对侧 CST 的 FA 值无明显变化，但随着时间的延长明显高于正常值，与一号猴相符。







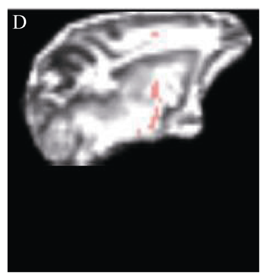
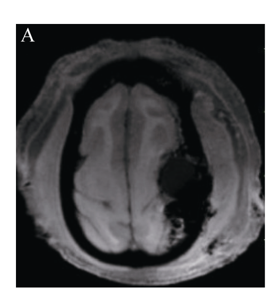
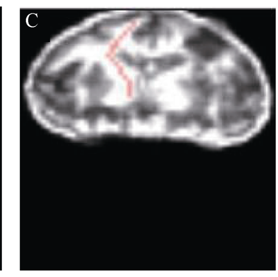


图 1　一号猴球囊置入术后 MRI
Figure 1　Macaque 1 postoperative MRI







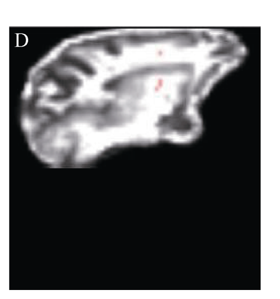


图 2　二号猴球囊置入术后 MRI 影像
Figure 2　Macaque 2 postoperative MRI
A：置入球囊当天 T1 像，平均 FA 后的感兴趣区（CST）： B：轴位、C：冠状位、D：矢状位。
A: postoperative T1 image. Anatomical regions of interest (CST): B: axial view; C: coronal view; D: sagittal view.

3　讨　论

本研究中猕猴大脑运动区占位病变模型中的球囊注水渐进式增多，逐渐压迫大脑皮层，可较好地模拟临床过程，实验对象虽仅限于两只猕猴，但两者的临床表现、影像学和实验数据等检测指标合理可信，易于重复。由于 DTI 能够敏感定量分析大脑的微细结构,而且在大脑白质纤维的成像方面具有独到之处 (Tang et al,2012)，故可用于监测模型病变对侧 CST 动态变化过程。而 FA 能够量化水分子扩散的各向异性程度， FA 值升高代表 CST 传导功能升高 (Jellison et al,2004)，可用于评价脑白质纤维的完整程度。

实验中两只猕猴行球囊置入手术后均出现了对侧肢体偏瘫，DTI 敏感观察到球囊置入手术后病变健侧 CST 出现代偿，短期内，即使占位解除这一作用仍明显，大脑皮质总体积 3%为神经元胞体，其余 97%为轴突、树突和神经胶质等，当部分神经元死亡，功能下降时，周围存活细胞中大量的轴突可通过侧枝出芽取代损伤的轴突，重建已散失神经支配的组织的神经控制 (Fenrich et al,2007)，同时，成年动物大脑中轴突分枝非常稳定, 轴突也保留着一定程度的结构可塑性 (Rao et al,2012)。因此，神经细胞轴突代偿可导致平行于 CST 走向的水分子

运动增加，同时，髓鞘也可能由于代偿性改变而导致垂直于 CST 走向的水分子运动受限增加、自由度减少，而两者的共同作用将导致病变对侧 FA 值升高。球囊取出后，由于肢体功能尚未恢复，可能存在的反馈作用导致短期内健侧 ROI 区域 FA 值仍然升高，提示健侧 CST 出现代偿作用。Yeo et al (2010) 发现一侧桥脑出血患者的对侧运动皮质代偿、参与肢体运动恢复的皮质重组，或其他相关纤维束的代偿作用，可能有助于其肢体功能恢复，支持本实验结果。

综上所述，我们认为猕猴大脑运动区占位病变健侧 CST 可出现代偿现象，且该现象即使在占位解除后的短期内仍然明显，提示健侧 CST 参与肢体功能的恢复，推测患者锻炼健侧肢体有助于患侧肢体功能的恢复。

参考文献：

Barrick TR, Clark CA. 2004. Singularities in diffusion tensor fields and their relevance in white matter fiber tractography. *Neuroimage,* **22**(2): 481-491.

Beaulieu C, Allen PS. 1994. Water diffusion in the giant axon of the squid: implications for diffusion weighted MRI of the nervous system. *Magnetic Resonance in Medicine,* **32**(5): 579-583.

Chenevert TI, Brunberg JA, Pipe JG. 1990. Anisotropic diffusion within human white matter: demonstration with NMR techniques in *vivo*. *Radiology,* **177**(2): 401-405.

Dong Y. 2006. Motor cortex activation during treatment may predict therapeutic gains in paretic hand function after stroke. *Stroke,* **37**(6): 1552-1555.

Eriksson SH, Rugg-Gunn FJ, Symms MR, Barker GJ, Duncan JS. 2001. Diffusion tensor imaging in patients with epilepsy and malformations of cortical development. *Brain,* **124**(Pt 3): 617-626.

Fenrich KK, Skelton N, MacDermid VE, Meehan CF, Armstrong S, Neuber-Hess MS, Rose PK. 2007. Axonal regeneration and development of de novo axons from distal dendrites of adult feline commissural interneurons after a proximal axotomy. *Journal of Comparative Neurology,* **502**(6): 1079-1097.

Jellison BJ, Field AS, Medow J, Lazar M, Salamat MS, Alexander AL. 2004. Diffusion tensor imaging of cerebral white matter: a pictorial review of physics, fiber tract anatomy, and tumor imaging patterns. *American Journal of Neuroradiology,* **25**(3): 356-369.

Klose U, Mader I, Unrath A, Erb M, Grodd W. 2004. Directional correlation in white matter tracks of the human brain. *Journal of Magnetic Resonance Imaging,* **20**(1): 25-30.

Kuai XL, Gagliardi C, Flaat M, Bunnell BA. 2009. Differentiation of nonhuman primate embryonic stem cells along neural lineages. *Differentiation,* **77**(3): 229-238.

Le Bihan D. 2003. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nature Reviews Neuroscience,* **4**(6): 469-480.

Liao CH, Su B. 2012. Research proceedings on primate comparative genomics. *Zoological Research,* **33**(1): 108-118. [廖承红, 宿兵. 2012. 灵长类比较基因组学的研究进展. 动物学研究, **33**(1): 108-118.]

Meintzschel F, Ziemann U. 2006. Modification of practice-dependent plasticity in human motor cortex by neuromodulators. *Cerebral Cortex,* **16**(8): 1106-1115.

Rao XP, Xu ZX, Xu FQ. 2012. Progress in activity-dependent structural plasticity of neural circuits in cortex. *Zoological Research,* **33**(5): 527-536. [饶小平, 许智祥, 徐富强. 2012. 大脑皮层内活动依赖的神经环路结构可塑性研究进展. 动物学研究, **33**(5): 527-536.]

Susan S. 2005. Gray`s Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice, 39/E. London: Elsevier, 458-562.

Tang XY, Xia LM, Zhu WZ. 2012. DTI study off relationship between infarction damage as well as Wallerian degeneration of CTS and motor function following chronic cerebral infarction. *Radiologic Practice,* **27**(5): 484-488. [汤翔宇, 夏黎明, 朱文珍. 2012. 慢性期脑梗死患者脑梗死灶扩散变化及 Wallerian 变性与运动功能关系 DTI 研究. 放射学实践, **27**(5): 484-488.]

Teasdale G, Jennett B. 1974. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet,* **2**(7872): 81-84.

Yeo SS, Choi BY, Chang CH, Jang SH. 2010. Transpontine connection fibers between corticospinal tracts in hemiparetic patients with intracerebral hemorrhage. *European Neurology,* **63**(3): 154-158.

Yu CS, Zhu CZ, Zhang YJ, Chen H, Qin W, Wang ML, Li KC. 2009. A longitudinal diffusion tensor imaging study on Wallerian degeneration of corticospinal tract after motor pathway stroke. *Neuroimage,* **47**(2): 451-458.

动 物 学 研 究 2013，Apr. 34(2): 108−115 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2013.02108

链脲佐菌素诱导树鼩 2 型糖尿病

吴晓云[1]，李昀海[1]，常 青[1]，张林强[1]，廖莎莎[1]，梁 斌[1,2,3,*]

1. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室，云南 昆明 650223；
2. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院昆明灵长类研究中心，云南 昆明 650223；
3. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院树鼩繁殖基地，云南 昆明 650223

摘要：链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ)是链球菌产生的天然化合物，对哺乳动物的胰岛 B 细胞有特异毒性，被广泛用于诱导 1 型和 2 型糖尿病。该研究通过多次小剂量注射 STZ 来建立树鼩 2 型糖尿病动物模型。24 只树鼩被分为对照组以及 60、70 和 80 mg/kg 剂量 STZ 诱导组。注射 STZ 后，成模树鼩出现明显的多饮、多食和多尿症状，平均体重未减轻，高血糖症状持续 8～16 周，尿糖显著阳性，肾功能及糖耐受明显受损，糖脂代谢紊乱，但未出现糖尿病乳酸中毒和高血糖高渗等并发症。该结果表明，多次小剂量 STZ 注射可诱导树鼩出现类似 2 型糖尿病症状和糖尿病肾脏损伤，且综合考虑 STZ 注射次数、成模率以及成模稳定性，两次注射 80 mg/kg 剂量的 STZ 较适合用于创建树鼩 2 型糖尿病模型。

关键词：树鼩；2 型糖尿病；链脲佐菌素
中图分类号：Q493.4 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2013)02-0108-08

Streptozotocin induction of type 2 diabetes in tree shrew

Xiao-Yun WU[1], Yun-Hai LI[1], Qing CHANG[1], Lin-Qiang ZHANG[1], Sha-Sha LIAO[1], Bin LIANG[1,2,3,*]

1.Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China；
2. *Kunming Primate Research Center, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China；*
3. *Tree Shrew Inbreeding Center, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China*

Abstract: The aim of this study was to induce type 2 diabetes in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). Streptozotocin (STZ), a glucosamine derivative of nitrosourea and preferentially toxic to pancreatic beta cells, has been commonly used to induce type 1 and 2 diabetes in experimental animals. Tree shrews were treated with different low doses of STZ (60, 70, and 80 mg/kg), with six control tree shrews receiving citrate buffer. After STZ injection, tree shrews displayed increased fasting blood and urine glucose, impaired oral glucose tolerance test, and disturbed lipids metabolism and renal function. However, STZ induced tree shrews showed no diabetic complications such as diabetic lactic acidosis and hyperglycemic hyperosmolar. Animals with the above type 2 diabetic-like symptoms were variable across the three groups from 66.7% to 100%, and mortality ranged from 16.7% to 33.3%. Thus, two 80 mg/kg STZ dose injections were appeared more appropriate than other doses to induce tree shrew model of type 2 diabetes. Our results demonstrated that type 2 diabetes could be induced with favorable STZ application in tree shrew.

Keywords: Tree shrew; Type 2 diabetes; Streptozotocin

糖尿病是以高血糖为主要标志的代谢性疾病，由于遗传因素、环境因素以及两者之间的相互作用等，将出现胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能失常引起的相对胰岛素不足。目前，全世界糖尿病患者～2.85 亿，未来 20 a 的发病率将增长 1 倍 (Shaw et al, 2010)。我国糖尿病患者已达 9240 万，糖尿病前期患者 1.48 亿，为全球糖尿病患者最多的国家 (Yang et al, 2010)。据中华医学会糖尿病分会、国际糖尿病联合会在 2010 年联合国糖尿病日发布的一项糖尿病对社会经济影响的研究结果显示，我国糖尿病导致的直接医疗开支占全国医疗总开支的 13%，达 1 734 亿人民币。显然，2 型糖尿病患病率的快速增

收稿日期：2012-12-10；接受日期：2013-01-14
基金项目：生命科学领域基础前沿研究专项(KSCX2-EW-J-23)；中国科学院知识创新工程重要方向(KSCX2-EW-R-12)；“863”计划(2012AA021801，2012AA022402)；西部之光“西部博士”项目(吴晓云)；国家自然科学基金(U1202223，Y301261041)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: liangb@mail.kiz.ac.cn

长不仅严重危害我国以及全世界人民的生命健康，也给个人和国家带来了巨大的经济损失。

糖尿病主要分为 1 型 (胰岛素依赖型)和 2 型(非胰岛素依赖型)。一般认为，1 型糖尿病源于自身免疫系统紊乱，即胰岛内分泌胰岛素的 β 细胞被体内免疫系统攻击而凋亡，导致胰岛素缺乏。1 型糖尿病发病较早 (大多<16 a)，起病急且症状明显，多见消瘦及酮症，需依赖胰岛素治疗，且易出现酮症酸中毒等急性并发症。2 型糖尿病则是一种典型的代谢紊乱，为糖尿病的最主要类型 (占患者的90%)，以出现胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能失常引起的相对胰岛素不足为特征。2 型糖尿病发病较晚(大多>40 a)，起病缓，多见超重和肥胖，无酮症，不依赖于胰岛素治疗，但易出现循环系统并发症，且病因复杂，涉及各种遗传因素、环境因素以及两者之间的相互作用等，具体的致病机理至今尚不清楚。

通过建立动物模型来研究 2 型糖尿病的发病机制是预防和治疗糖尿病的有效途径。目前，链脲佐菌素 (streptozotocin，STZ)被广泛地应用于创建糖尿病动物模型。STZ 是结构类似于葡萄糖和 N-乙酰氨基葡萄糖 (N-acetyl glucosamine，GlcNAc)的抗生素，通过 GLUT 2 转运到胰腺 β 细胞后，可使 DNA 断裂引起 β 细胞凋亡，从而诱发高血糖。根据 STZ 注射剂量的大小以及注射次数的多少可以创建不同类型的糖尿病动物模型 (Deeds et al, 2011; Junod et al, 1967; Kuttler & Schneider, 1982; Rerup, 1970)。在啮齿类和非人灵长类动物中，可分别采用一次性大剂量和多次小剂量的注射方式创建类似 1 型和 2 型糖尿病的动物模型 (Erdal et al, 2011; Junod et al, 1969; Kavanagh et al, 2011; Koulmanda et al, 2003; Nain et al, 2012; Ventura-Sobrevilla et al, 2011; Wei et al, 2011; Wu et al, 2009)。但由于种属差异性，啮齿类动物 (大、小鼠)糖尿病模型往往仅吻合人类糖尿病的部分病理过程和特征 (Srinivasan & Ramarao, 2007)，而尽管非人灵长类动物糖尿病模型的血糖规律及病理特征均与人类糖尿病患者的临床特征最为相似 (Wagner et al, 2006)，但却受限于伦理、资源稀缺、遗传操作困难、成本高及周期长等，很难得到广泛应用。因此，需要去寻找一种适用于糖尿病研究的动物模型。

树鼩 (*Tupaia belangeri chinensis*)隶属于攀鼩目 (Scandentia)树鼩科 (Tupaiinae)，是灵长类动物的近亲。Rabb et al (1966)在两只菲律宾树鼩(*Urogale everetti*)中观察到自发糖尿病，这些树鼩的表型，如酮症、脱发及白内障等均与人类糖尿病表型一致，且病理学检查显示其胰腺小岛的 β 细胞缺失，被纤维细胞代替，与人类糖尿病发病机理一致。Ishiko et al (1997)和 Xian et al (2000)初步报道了利用不同浓度的 STZ 诱导树鼩糖尿病。然而，菲律宾树鼩和树鼩分属两个属，物种间存在较大差异(Fuchs，1999)。STZ 注射虽然可以诱导树鼩糖尿病，但由于所用 STZ 剂量较高，导致糖尿病发病症状类似于 1 型糖尿病。因此，本文拟通过注射低剂量 STZ 来创建树鼩 2 型糖尿病动物模型，以期为研究 2 型糖尿病发病机理提供新的动物模型。

1　材料和方法

1.1　实验动物

24 只健康成年雄性树鼩，体重 121～160 g，均来自中国科学院昆明动物研究所动物实验中心。动物单笼饲养于 12 h 人工光照(光照时间 08:00—20:00)的动物房中，室温(25±3) ℃，湿度 40%～60%,自由饮食饮水,每天清理动物笼舍 1 次。实验所用的树鼩饲料来自昆明医科大学实验动物中心，含粗蛋白 22.1%，粗脂肪 6%，总热量～4 000 kcal/kg (16747 kJ/kg)。所有动物在实验前适应饲养>6 周。本实验方案获得了中国科学院昆明动物研究所实验动物伦理委员会批准 (批准号：SYBW20110101-1)。

1.2　实验器材及材料

血糖检测使用罗氏 Accu-Chek Performa Blood Glucose Meter 血糖测试仪；STZ 购自 Sigma 公司(S0130)；普通胰岛素购自江苏万邦生化医药股份有限公司；50%葡萄糖注射液购自昆明南疆制药有限公司。

1.3　动物分组及造模

动物随机分为 4 组，每组 6 只 (表 1)。 A-con 组：分别在第 1 天和第 3 天腹腔注射 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 4.2～4.5)，注射时，将动物装入不透光的布袋子中，待其安静 20 min 后给予注射和血糖监测。A-60 组：2～3 次腹腔注射 60 mg/kg 的 STZ (STZ 溶于 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液中，pH 4.2～4.5，新鲜配制的 STZ 溶液需在 15 min 内用完)，第一次注射后，每天监测血糖值，如动物空腹血糖值≤7.0 mmol/L，再补充注射，其中 4 只动物各注射

3 次 (分别在第 1 天，第 3 天和第 4 天)，另两只动物各注射两次 (第 1 天和第 3 天)。A-70 组：2～3 次腹腔注射 70 mg/kg 的 STZ；第一次注射后，每天监测血糖值，如动物空腹血糖值≤7.0 mmol/L，再补充注射。其中 4 只动物注射各 3 次 (第 1 天、第 3 天和第 5 天)，另两只动物各注射两次 (第 1 天和第 3 天)。A-80 组：两次腹腔注射 80 mg/kg 的 STZ，第一次注射后，每天监测血糖值，如动物空腹血糖值≤7.0 mmol/L，第 4 天补充注射 1 次。动物出现高血糖后，对于空腹血糖浓度>20.0 mmol/L 的动物每天给予普通胰岛素注射 1 次，胰岛素注射量从最初的 1 U/kg 逐渐增加到 8 U/kg。由于 A-60 组中的成模动物在第 9 周时出现意外死亡和转阴，实验仅持续 9 周，另两组实验持续 16 周。

表 1 不同剂量 STZ 组动物成模率、死亡率及转阴率比较
Table 1 Success, mortality, and cure rates of diabetic tree shrews dosed with different concentrations of Streptozotocin

组别 Group	数量 (*n*) Number	成模率 Success rate	死亡率 Mortality rate	转阴率 Cured rate
A-con	6	0 (0.0%)	0 (0.0%)	—
A-60	6	4 (66.7%)	1 (16.7%)	2 (50%)
A-70	6	4 (66.7%)	1 (16.7%)	0 (0.0%)
A-80	6	6 (100.0%）	2 (33.3%)	0 (0.0%)

1.4 指标检测

所有动物在造模后每周测量空腹体重和空腹血糖各 1 次。测量前过夜禁食，所有动物分别装入布袋中称量体重，并从尾静脉采血一滴，使用血糖仪测量血糖。另外，分别于造模前、后的每 4 周从股静脉采血～1 mL，检测空腹状态下糖化血红蛋白(HbA1c)、甘油三酯(TG)及总胆固醇(TCHOL)等生化指标。在第 8 周时采集动物尿液 3～5 mL，检测尿糖、酮体、尿微量白蛋白和尿肌酐等。所有检测均由云南省第一人民医院雅培 Ci16200 全自动生化分析仪完成。

1.5 口服葡萄糖耐量试验

于成模后第 4 周和第 10 周进行口服葡萄糖耐量实验。所有动物实验前禁食 12 h，测量空腹体重和空腹血糖。根据每只动物的体重分别饲喂 4 mg/kg 的葡萄糖，于饲喂后 20、40、60、90、120 及 180 min 分别从尾静脉采血一滴测定血糖。

1.6 胰岛素耐量试验

于成模后第 5 周进行胰岛素耐量实验。动物未禁食，测量体重及血糖。根据体重注射 1 U/kg 的普通胰岛素，测量注射后 15、30、45、60 及 120 min 的血糖值，并以 0 min 血糖值为基准，分别计算 15、30、45、60 及 120 min 的血糖值与其的比值，用以衡量血糖下降速度。

1.7 数据分析

利用 Excel 分析数据。所有数据以 mean±*SE* 表示，组间比较使用 *t*-test，$P<0.05$ 为差异显著。

2 结 果

2.1 各组动物成模情况

各组树鼩是否形成稳定的糖尿病以连续 4 周空腹血糖值≥7.0 mmol/L 或糖化血红蛋白(HbA1c)≥6.5%为标准(中华医学会糖尿病学分会, 2011)。随着 STZ 注射剂量的加大，动物成模率和死亡率都有所增加 (表 1)。注射 STZ 60、70 及 80 mg/kg 的动物成模率分别为 66.7%、66.7%和 100%，死亡率分别为 16.7%、16.7%和 33.3%。60 mg/kg STZ 动物成模后，第 4 周的转阴率高达 50%，而 70 和 80 mg/kg STZ 动物的转阴率为 0 (表 1)。

2.2 STZ 注射后各组动物的体重和血糖变化

A-con 组动物的平均体重和平均空腹血糖值维持在稳定水平，未出现明显变化 (图 1)。其他 3 组动物在分别注射不同剂量 (60、70 和 80 mg/kg)STZ 一周后，体重稍下降，但与注射前相比无显著差异

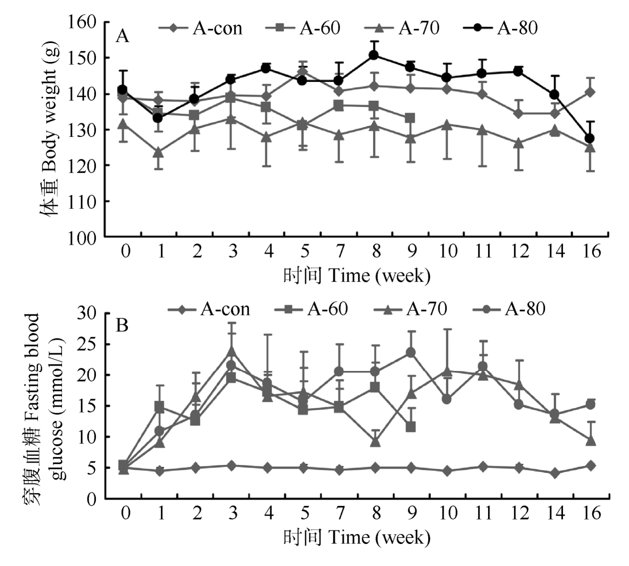
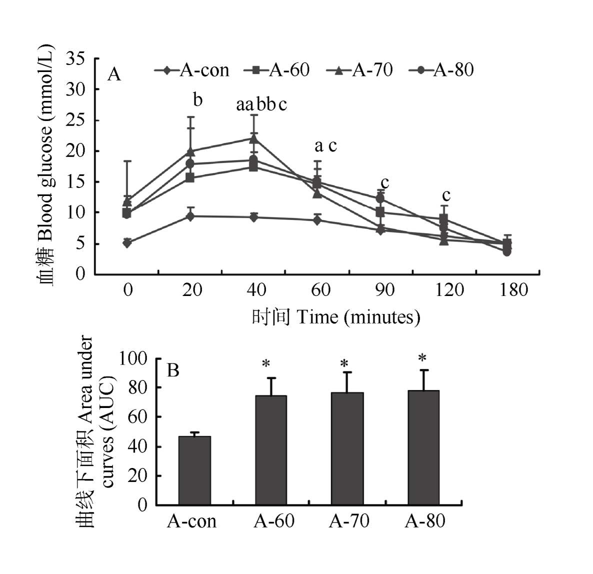


图 1 各组树鼩体重(A)和空腹血糖(B)变化趋势
Figure 1 Changes in body weight (A) and fasting blood glucose (B) in four groups of tree shrew

(*P*>0.05)，且在随后的 15 周内体重恢复到注射前水平。其中，A-80 组动物的平均体重还出现少许增长，虽在第 16 周有所下降，但与实验前 0 周相比无显著差异 (*P*>0.05)(图 1A)。注射不同剂量 STZ 的 3 组动物的平均空腹血糖在注射一周后大幅上升，其中，A-60 组动物在注射后第 8 周的平均空腹血糖值为(14.23±4.15) mmol/L，A-70 和 A-80 组动物在注射后第 16 周的平均空腹血糖值分别为(15.10±5.33)和(16.54±4.95) mmol/L，与对照组相比均显著升高(*P*<0.0001)(图 1B)。

2.3　口服葡萄糖耐量试验和胰岛素耐量试验

第 4 周口服葡萄糖耐量试验显示，A-60、A-70 和 A-80 动物在饲喂葡萄糖后的 20、40、60 及 90 min 出现明显的高血糖，远高于 A-con 组动物，且 A-con 组动物的口服葡萄糖耐量峰值出现在 20 min，而 A-60、A-70 和 A-80 组动物的波峰延迟，均出现在 40 min (图 2A)。另外，A-60、A-70 及 A-80 组的糖耐量曲线下面积均显著高于 A-con 组 (依次分别为 (74.43±12.18) 、 (76.93±13.67) 、 (77.77±14.38) 和 (46.57±3.09)，*P*<0.05) (图 2B)，各组糖耐量均显著受损。第 10 周时，A-60 组成模动物意外死亡，转阴动物的口服葡萄糖耐量曲线仍显示不正常，虽然其在 20、40 及 60 min 的血糖值均低于 A-con 组动物的血糖值，但血糖持续上升到 90 min 才出现峰值。A-70 和 A-80 组动物在各个时间点的血糖值均显著高于对照组和 A-60 组，而 A-80 组动物的峰值仍出现在 40 min。糖耐量曲线下面积也显示 A-70 和 A-80 组显著高于 A-con 和 A-60 组(依次分别为 (130.4±24.32) 、 (130.55±4.76) 、 (67.33±6.65) 和 (61.58±1.81)，*P*<0.05)，糖耐量显著受损。



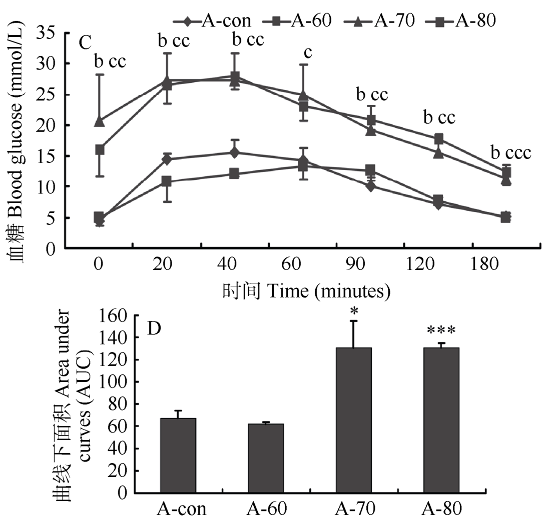


图 2　第 4 周(A, B)和第 10 周 (C, D) 时的各组口服糖耐量试验曲线(A, C)及曲线下面积(B, D)

Figure 2　Oral glucose tolerance test curve (A) and areas under the curve (B) in four groups of tree shrew

*: *P*<0.05; **: *P*<0.01; ***: *P*<0.001; a: A-60 vs A-con; b:A-70 vs A-con; c:A-80 vs A-con.

在胰岛素耐量实验中，A-60 和 A-70 动物的血糖下降幅度虽高于对照组，但均不显著(*P*>0.05)，A-80 动物的血糖下降幅度在 30、60 及 90 min 显著高于对照组 (*P*<0.05)(图 3)，表现一定程度的胰岛素分泌不足。

2.4　血液生理生化指标

2.4.1　糖、脂及胆固醇代谢变化

A-con 组动物的糖化血红蛋白、甘油三酯和总胆固醇水平均无显著变化(表 2)。A-60、A-70 和 A-80 组的糖化血红蛋白含量在 STZ 注射后第 4 周、第 8 周和第 16 周与注射前及 A-con 组相比均显著升高 (*P*<0.05)，A-70 和 A-80 组的该指标增加 2～3 倍。A-60 和 A-70 组甘油三酯的含量在 STZ 注射后第 4 周与注射前相比均显著升高[分别为(0.87±0.33) mmol/L 和 (0.73±0.24) mmol/L，*P*<0.05]，而在第 8 周、第 12 周和第 16 周则均无显著变化 (*P*<0.05)。A-70 组甘油三酯的含量在第 16 周显著下降[(0.35±0.14) mmol/L，*P*<0.05]。相比注射前的 A-con 组，A-80 组甘油三酯的含量在第 4 周、第 12 周和第 16 周均略有升高，但变化不显著，而在第 8 周时显著升高[(0.85±0.35)mmol/L，*P*<0.05]。

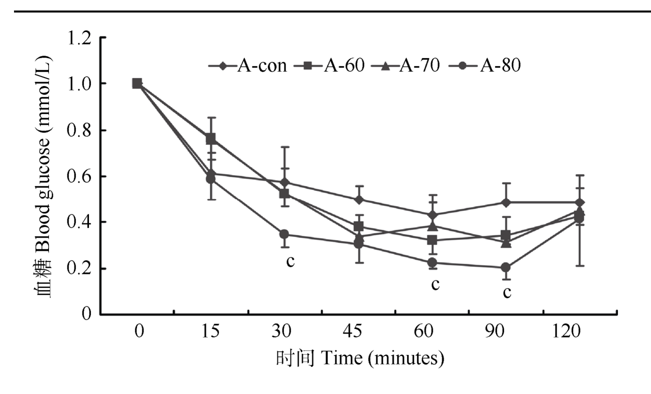


图3 第5周时的各组胰岛素耐量曲线

Figure 3 Insulin tolerance test curve for four groups of tree shrew

c: P<0.05; c: A-80 vs A-con.

相比A-con组及注射前，A-60组动物的总胆固醇含量在STZ注射后第4周和第8周均无显著变化。A-70组的总胆固醇含量仅在STZ注射后第4周相对A-con组显著增高[(2.35±0.55) mmol/L，P<0.05]，而在第8周、第12周和第16周均无显著变化。A-80组的总胆固醇含量在STZ注射后，相对A-con和注射前均有所升高，但仅在第4周时具显著水平[(2.19±0.12) mmol/L，P<0.05](表2)。

2.4.2 肾功能分析

血尿素氮含量是反映肾功能的指标之一。尿素氮含量在注射不同剂量的STZ后均大幅升高。A-60组尿素氮平均值在第4周和第8周时都较注射前升高～6 mol/L，在第4周时显著升高[(10.98±4.39) mmol/L，P<0.05]。A-70和A-80组动物在STZ注射后第16周，尿素氮含量较注射前显著升高2～3倍(P<0.05)(表2)。

另外，在我们分别取第8周时对照组和成模动物尿液，检测其是否出现糖尿病肾病并发症(表3)。尿糖含量在成模动物中均为“++++”，而A-con组动物没有检测到尿糖。在所有动物中均未检测到酮体，表明树鼩糖尿病并非1型糖尿病。成模组尿微量白蛋白含量为对照组的～3倍，而成模组和对照组的尿肌酐无显著差异(P<0.05)。成模组尿微量白蛋白/尿肌酐比值为对照组的～5倍。

2.4.3 乳酸及渗透压变化

为检验动物在注射STZ后是否出现糖尿病乳酸中毒和高血糖高渗，我们检测了乳酸、血钠和血钾含量(表2)。这3个指标在对照组和STZ注射组均呈现相同的趋势，即对照组及STZ组乳酸含量降低，各组血钠值均升高，血钾值均降低。

3 讨论

本实验发现，多次小剂量STZ (60～80 mg/kg)注射可诱导树鼩出现明显的糖尿病症状。成模动物均持续9～16周的高血糖，其糖化血红蛋白显著升高，且口服葡萄糖耐量明显受损(表2，图1，图2)。该结果与前人使用一次性大剂量STZ (300 mg/kg) (Ishiko et al，1997)和一次性注射80、100、120及150 mg/kg STZ (Xian et al，2000)的结果基本一致。但是，Xian et al (2000)注射80、100及120 mg/kg STZ不能建立长期稳定的模型，不成模率和转阴率较高，而150 mg/kg STZ则造成动物出现典型的“三多一少”症状。Ishiko et al (1997)使用300 mg/kg的剂量则可以在2周内诱导动物出现白内障。这些研究结果表明树鼩所出现的糖尿病症状更类似于1型糖尿病。Li (2010)曾分别在第1天、第7天和第28天注射120 mg/kg STZ，诱导树鼩出现2型糖尿病症状。然而，我们前期的探索实验中曾经使用高剂量STZ (120 mg/kg)注射树鼩，在两周内由于血糖过高导致个体全部死亡。目前并不清楚是什么原因导致不同研究人员的实验结果出现显著差别。

本研究使用多次小剂量STZ注射创建的树鼩糖尿病发病症状更类似2型糖尿病。前人经验表明多次小剂量STZ注射可以部分破坏胰岛β细胞，并引起巨噬细胞和淋巴细胞浸润等炎症反应，最终导致胰岛素分泌不足(Kolb & Kröncke, 1993)。因此，糖耐量试验和胰岛素耐量试验结果分别显示树鼩注射STZ后出现糖耐受受损和胰岛素相对分泌不足(图2，图3)。树鼩注射STZ后，虽出现多饮、多食和多尿症状，但是，除A-80组动物在第16周时出现体重下降，动物在整个实验过程中，体重均维持稳定(图1A)。该结果与STZ诱导CD1小鼠的结果一致(Ventura-Sobrevilla et al, 2011)。另外，尿液中是否存在酮体也是区别1型和2型糖尿病的重要指标(中华医学会糖尿病学分会, 2011)。在本实验中，STZ组树鼩的尿液检测分析均未出现酮体阳性，而且，其乳酸、血钠及血钾水平与同时期对照组相比亦未显著升高，且成模动物未出现明显的血糖高渗状态和乳酸性中毒(表2)症状。这些结果均表明多次小剂量STZ诱导的树鼩糖尿病症状与1型糖尿病不相似，而更类似于2型糖尿病。

表 2　STZ 诱导造模各时期血液生理生化指标检测

Table 2　Comparison of plasma chemical indexes in tree shrews induced by different doses of STZ

	0 周 0 weeks	4 周 4 weeks	8 周 8 weeks	12 周 12 weeks	16 周 16 weeks
血糖 GLU (mmol/L)					
A-con	3.53±1.03	5.28±0.67 *	4.98±0.65 *	4.98±1.28	4.64±0.38 *
A-60	4.00±1.41	19.44±4.56 *#	17.86±9.94 *#		
A-70	5.12±1.86	24.05±9.56 *#	9.38±3.67 *#	18.38±8.66 *#	9.40±6.78
A-80	4.72±1.20	21.63±10.95 *#	20.48±9.39 *#	15.13±5.84 *#	23.60±14.71 *#
糖化血红蛋白 HbA1c (%)					
A-con	4.55±0.18	5.35±0.15 *	4.51±0.21	4.77±0.24	4.40±0.14
A-60	4.25±0.32	7.78±1.46 *#	7.15±2.29 #		
A-70	4.52±0.80	9.05±0.78 *#	10.53±2.98 *#	10.85±2.72 *#	12.47±3.02 *#
A-80	4.73±0.61	8.45±1.23 *#	10.84±2.32 *#	12.10±2.74 *#	14.09±2.96 *#
总蛋白 TP (g/L)					
A-con	66.00±6.93	62.33±5.13	63.67±2.66	64.67±3.01	61.17±1.60
A-60	67.50±5.32	68.00±4.06	67.80±3.03 #		
A-70	68.00±5.83	68.25±4.57	68.00±2.94 #	68.25±4.19	60.67±2.08
A-80	63.17±15.56	70.25±4.50 #	71.50±4.04 #	67.00±3.46	72.00±13.89
白蛋白 ALB (g/L)					
A-con	28.00±5.02	24.17±1.94	25.33±1.86	24.67±2.66	22.67±1.63 *
A-60	29.50±6.41	25.40±4.04	25.00±2.83		
A-70	30.17±7.03	29.75±1.89 #	24.50±1.73	26.50±1.73	23.33±0.58
A-80	26.00±7.24	28.00±3.16 #	29.50±1.91 #	28.33±3.21	26.33±7.51
球蛋白 GLOB (g/L)					
A-con	38.00±3.03	38.17±5.81	38.33±3.72	40.00±4.56	38.50±1.97
A-60	38.00±4.38	42.60±4.83	42.80±1.10 *#		
A-70	37.83±2.79	38.50±5.51	43.50±3.42 *	41.75±3.59	37.33±2.52
A-80	37.17±10.05	42.25±5.12	42.00±4.24	38.67±0.58	45.67±6.43 #
甘油三酯 TG (mmol/L)					
A-con	0.37±0.17	0.55±0.19	0.51±0.12	0.38±0.10	0.48±0.11
A-60	0.47±0.23	0.87±0.33 *	0.63±0.19		
A-70	0.44±0.10	0.73±0.24 *	0.50±0.19	0.35±0.14	0.23±0.12 *
A-80	0.42±0.21	0.68±0.19	0.85±0.35 *	0.53±0.16	0.50±0.33
总胆固醇 TCHOL (mmol/L)					
A-con	1.90±0.50	1.89±0.19	2.01±0.35	1.89±0.32	1.84±0.24
A-60	2.14±0.55	2.04±0.42	1.81±0.23		
A-70	2.12±0.28	2.53±0.55 #	2.20±0.66	2.52±0.63	2.35±0.71
A-80	1.90±0.22	2.19±0.12 *#	2.26±0.37	2.09±0.02	3.39±1.51 #
尿素氮 BUN (mmol/L)					
A-con	6.85±2.36	7.72±2.18	6.38±1.49	7.12±0.85	5.35±1.33
A-60	4.37±2.76	10.98±4.39	10.20±6.18		
A-70	3.52±1.92	12.58±4.43 *#	10.25±4.70	10.30±5.05	15.73±6.96 *#
A-80	4.11±2.41	15.10±2.52 *#	9.40±1.44 *#	8.77±3.19	21.03±15.89 *#
乳酸 LAC (mmol/L)					
A-con	7.98±1.46	7.32±2.37	6.23±1.14 *	6.10±0.88 *	6.30±1.29
A-60	7.32±4.87	7.26±1.82	7.00±1.95		
A-70	6.56±5.29	7.58±2.32	5.43±2.33	6.95±1.34	3.50±0.61 #
A-80	6.04±3.61	6.20±2.19	5.93±1.29	4.97±3.04	4.87±1.10
钠 Na^+(mmol/L)					
A-con	146.83±2.64	172.83±6.91 *	172.50±7.26 *	176.40±9.84 *	176.67±10.78 *
A-60	157.00±12.03	174.60±9.32 *	178.60±12.20 *		
A-70	170.20±23.25	175.67±8.33	185.00±8.29	181.00±5.94	166.00±1.73
A-80	165.50±10.12	178.75±15.86	165.00±3.74 ∞	170.67±2.08 ∞	180.33±17.10
钾 K^+(mmol/L)					
A-con	8.47±0.85	7.03±0.96 *	6.25±0.98 *	6.73±1.23 *	6.22±0.68 *
A-60	7.60±2.03	6.68±0.82	5.72±0.85		
A-70	7.46±1.82	5.48±0.88 #	5.73±0.67	5.60±0.82	6.23±0.25
A-80	7.80±1.47	5.73±0.93	4.60±0.70 *#	5.63±0.72	6.70±1.11

*: $P<0.05$ vs baseline; #: $P<0.05$ vs control group; ∞: A-70 vs A-80, $P<0.05$.

表 3 成模动物尿液指标检测

Table 3 Comparison of urine chemical indexes between control and diabetic tree shrews

	尿糖 uGLU	酮体 KET	尿微量白蛋白 MA (mg/L)	尿肌酐 uCREA (μmol/L)	尿微量白蛋白/尿肌酐 MA/uCREA (μg/μmol)
A-con	−	−	5.04±2.95	1982.5±819.56	2.47±0.82
成模动物 modeled animals	++++	−	16.03±3.87 ***	1417.00±245.66	11.31±1.81 ***

***: P<0.001 *vs* A-con group.

STZ 注射后，A-70 和 A-80 组动物的甘油三酯和总胆固醇含量均出现不同程度的升高，A-60 组仅甘油三酯含量升高 (表 2)。临床上，糖尿病患者多出现高甘油三酯血症及胆固醇升高等脂代谢紊乱，从而增加患心脑血管疾病的危险 (Shepherd, 1994)。高血糖引起血液中甘油三酯和胆固醇含量升高的一个主要原因是由于脂蛋白酯酶——水解甘油三酯的酶调控水平发生变化(Goldberg, 2001)。胰岛素可以激活脂蛋白酯酶，若出现胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺乏则会减少脂蛋白酯酶的激活，从而引起血液中甘油三酯含量升高，如果增加胰岛素敏感性或给予外源胰岛素注射，甘油三酯和胆固醇含量则会随之下降 (Goldberg, 2001; Taskinen & Nikkila, 1979)。胰岛素耐量试验显示树鼩注射 STZ 后胰岛素相对分泌不足(图 3)，提示这些树鼩的脂代谢出现紊乱。虽然有必要进一步检测各组动物脂蛋白酶活性的变化，但目前受检测技术的阻碍，暂时不能检测树鼩脂蛋白酶活性。

本实验成模动物肾脏功能明显受损 (表 2，表 3)。尿素氮及微量白蛋白尿检测是糖尿病肾病早期诊断的公认指标。本研究使用尿蛋白/肌酐比值来判断树鼩是否出现糖尿病肾病。我们发现成模动物的尿蛋白/肌酐比值显著高于对照组动物，且各组动物的血尿素氮相对注射前均提高 3～5 倍。同时，肾脏病理切片也显示部分成模动物出现轻微肾小球病变(结果未显示)。这些结果都提示 STZ 诱导的树鼩糖尿病模型表现明显的肾功能受损。该现象也见于 STZ 诱导的非人灵长类和啮齿类动物糖尿病模型 (Kramer et al, 2009; Palm et al, 2004)。由于 STZ 会对肾脏产生毒害 (Weiss, 1982)，那么，糖尿病动物模型的肾脏损害应归因于 STZ 的毒性还是长期高血糖的作用。Palm et al (2004)指出 STZ 诱导的糖尿病动物模型出现的尿蛋白渗漏部分归因于 STZ 的直接毒性，部分归因于长期的高血糖状态，而 Zafar et al (2009)分别对 STZ 诱导第 2 周、第 4 周和第 8 周的糖尿病大鼠的肾脏切片的观察则认为其肾脏损伤是由于 STZ 诱发的严重高血糖所导致。另外，也有报道称通过胰岛素治疗可以区分 STZ 损害和高血糖引起的肾功能受损 (Rasch, 1979，1980)。本实验中，使用胰岛素控制血糖的树鼩的尿微量白蛋白含量远低于未使用胰岛素控制的树鼩 (结果未显示)，但与对照组相比仍显著升高 (表 3)。然而，由于我们给予胰岛素的注射量仅用于降低动物的死亡率，并不足以控制血糖，因此，给予胰岛素控制的动物在第 16 周时，其血糖和糖化血红蛋白含量并未显著降低。因此，本实验中树鼩出现的肾脏损害是由高血糖或高血糖和 STZ 的共同作用导致仍需进一步研究。

由于 STZ 主要作用于胰岛 β 细胞，因此，STZ 诱导 2 型糖尿病的机理是使动物胰岛 β 细胞部分凋亡而引起胰岛素分泌相对不足。如果胰岛 β 细胞遭到大量破坏，胰岛素严重分泌不足则会使动物出现类似 1 型糖尿病的症状，甚至造成死亡。并且，不同种或不同遗传背景的动物使用 STZ 的剂量也大不相同 (Junod et al, 1969)。因此，合适的 STZ 注射剂量是创建不同类型糖尿病的关键。本研究采用多次小剂量 (60、70 及 80 mg/kg)注射 STZ 诱导树鼩糖尿病，由于各组造模动物的生理生化指标、糖耐量和胰岛素耐量曲线等均无明显差异，因此，可根据其成模率、发病症状及成模稳定性来判断适合造模的 STZ 剂量，且由于各组成模动物的发病特征表现一致，因此，我们通过成模率和成模稳定性来判断适用于创建类似 2 型糖尿病树鼩模型的剂量。A-60 组动物通过 2～3 次注射 60 mg/kg 的 STZ 后，成模率虽达到 66.7%，但在第 8 周时转阴率高达 50%，高血糖症状不能长期稳定维持。A-70 和 A-80 组动物的成模率分别为 66.7%和 100%，但没有动物转阴，且能维持 16 周的高血糖症状，A-70 组有 66.7%的动物需要注射 3 次 STZ 才能成模，而 A-80 组动物仅需两次注射即可成模。因此，两次注射 80 mg/kg 的 STZ 是建立树鼩糖尿病及并发症模型的较理想的造模方法。

参考文献：

Chinese Diabetes Society. 2011. Chinese Guideline for Type 2 Diabetes. Beijing: Peking University Medical Press. [中华医学会糖尿病学分会. 2011. 中国 2 型糖尿病防治指南. 北京: 北京大学医学出版社.]

Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, Eberhardt NL, Kudva YC. 2011. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Laboratory Animals,* **45**(3): 131-140.

Erdal N, Gurgul S, Kavak S, Yildiz A, Emre M. 2011. Deterioration of bone quality by streptozotocin (STZ)-induced type 2 diabetes mellitus in rats. *Biological Trace Element Research,* **140**(3): 342-353.

Fuchs E. 1999. Tree shrews. In: Poole T, editor. UFAW handbook on the care and management of laboratory animals, vol. 1,7th ed. Terrestrial vertebrates. Oxford: Blackwell. 235–245.

Goldberg IJ. 2001. Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,* **86**(3): 965-971.

Ishiko S, Yoshida A, Mori F, Abiko T, Kitaya N, Kojima M, Saito K. 1997. Early ocular changes in a tree shrew model of diabetes. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi,* **101**(1): 19-23.

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *Journal of Clinical Investigation,* **48**(11): 2129-2139.

Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. 1967. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,* **126**(1): 201-205.

Kavanagh K, Flynn DM, Nelson C, Zhang L, Wagner JD. 2011. Characterization and validation of a streptozotocin-induced diabetes model in the vervet monkey. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods,* **63**(3): 296-303.

Kolb H, Kröncke KD. 1993. IDDM: lessons from the low-dose streptozotocin model in mice. *Diabetes Reviews,* **1**: 116-126.

Koulmanda M, Qipo A, Chebrolu S, O'Neil J, Auchincloss H, Smith RN. 2003. The effect of low versus high dose of streptozotocin in cynomolgus monkeys (*Macaca fascilularis*). *American Journal of Transplantation,* **3**(3): 267-272.

Kramer J, Moeller EL, Hachey A, Mansfield KG, Wachtman LM. 2009. Differential expression of GLUT2 in pancreatic islets and kidneys of New and Old World nonhuman primates. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology,* **296**(3): R786-R793.

Kuttler B, Schneider E. 1982. Diabetes mellitus in mice induced by multiple subdiabetogenic doses of streptozotocin: age and sex dependence. *Acta Biologica et Medica Germanica,* **41**(12): 1199-1202.

Li HY. 2010. A Study on Artificial Induced Type 2 Diabetes Mellitus Animal Models in Tree Shrews. Mastre's Degree thesis, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College. [李海燕. 2010. 人工诱导树鼩 2 型糖尿病动物模型的研究. 硕士学位论文, 中国医学科学院, 北京协和医学院.]

Nain P, Saini V, Sharma S, Nain J. 2012. Antidiabetic and antioxidant potential of *Emblica officinalis* Gaertn. leaves extract in streptozotocin-induced type-2 diabetes mellitus (T2DM) rats. *Journal of Ethnopharmacology,* **142**(1): 65-71.

Palm F, Ortsäter H, Hansell P, Liss P, Carlsson PO. 2004. Differentiating between effects of streptozotocin per se and subsequent hyperglycemia on renal function and metabolism in the streptozotocin-diabetic rat model. *Diabetes Metabolism Research and Reviews,* **20**(6): 452-459.

Rabb GB, Getty RE, Williamson WM, Lombard LS. 1966. Spontaneous diabetes mellitus in tree shrews, *Urogale everetti*. *Diabetes,* **15**(5): 327-330.

Rasch R. 1979. Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. Kidney size and glomerular volume. *Diabetologia,* **16**(2): 125-128.

Rasch R. 1980. Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. Albumin excretion. *Diabetologia,* 18(5): 413-416.

Rerup CC. 1970. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacological Reviews,* **22**(4): 485-518.

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice,* **87**(1): 4-14.

Shepherd J. 1994. Diabetic dyslipidemia andatherosclerosis. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift,* **124**(44): 1933-1937.

Srinivasan,K., Ramarao, P. 2007. Animal models in type 2 diabetes research: An overview.*Indian Journal of Medical Research*. 125: 451-472.

Taskinen MR, Nikkila EA. 1979. Lipoprotein lipase activity of adipose tissue and skeletal muscle in insulin-deficient human diabetes. *Diabetologia,* **17**(6): 351-356.

Ventura-Sobrevilla J, Boone-Villa VD, Aguilar CN, Román-Ramos R, Vega-Avila E, Campos-Sepulveda E, Alarcon-Aguilar F. 2011. Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *Proceedings of the Western Pharmacology Society,* **54**: 5-9.

Wagner, J.D., Kavanagh, K., Ward, G.M., Auerbach, B.J. et al. 2006. Old world nonhuman primates models of type 2 diabetes mellitus. *ILAR Journal*，47(3): 259-71.

Wei LL, Lu YR, He SR, Jin X, Zeng L, Zhang S, Chen YN, Tian B, Mai G, Yang G, Zhang J, Wang L, Li HX, Markmann JF, Cheng JQ, Deng SP. 2011. Induction of diabetes with signs of autoimmunity in primates by the injection of multiple-low-dose streptozotocin. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* **412**(2): 373-378.

Weiss RB. 1982. Streptozotocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treatment Report,* **66**(3): 427-438.

Wu D, Zou C, Yue F, Li X, Li S, Zhang YA. 2009. The effect of long-term streptozotocin-induced diabetes mellitus (STZ-DM) on cynomolgus (*Macaca fascicularis*) monkeys. *Journal of Medical Primatology,* **38**(1): 15-22.

Xian S, Huang S, Su JJ, Qin YF, Ou C, Luo ZJ, Wei MY. 2000. A study on experimental diabetes animal models in tree shrews induced by streptozotocin. *Journal of Guangxi Medical University,* **17**(6): 945-949. [冼苏, 黄松, 苏建家, 秦映芬, 欧超, 罗佐杰, 韦敏怡. 2000. 链脲佐菌素诱导树鼩糖尿病动物模型研究. 广西医科大学学报, **17**(6): 945-949.]

Yang SH, Dou KF, Song WJ. 2010. Prevalence of diabetes among men and women in China. *New England Journal of Medicine,* **362**(25): 2425-2426.

Zafar M, Naqvi N, Ahmed M, Kaimkhani ZA. 2009. Altered kidney morphology and enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *International Journal of Morphology,* **27**(3): 783-790.

动　物　学　研　究　2013，Apr. 34(2): 116−120　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2013.02116

树鼩呼肠孤病毒的分离鉴定

徐　娟[1]，黄晓燕[1]，李晓飞[1]，王文广[1]，殷安国[2]，夏雪山[2]，孙晓梅[1,*]，代解杰[1,*]

1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室，云南 昆明　650118；

2. 昆明理工大学 生命科学与技术学院，云南 昆明　650500

摘要：致病性病毒严重危害树鼩 (tree shrew, *Tupaia*)生命健康，但却鲜见有关树鼩自然感染病毒的报道。该研究采集 6 份因腹泻死亡的野生树鼩粪便，用 Vero 细胞进行病毒分离，72 h 后细胞发生病变，特征为颗粒增多、破碎、变圆固缩、拉网及脱落等；电镜观察显示该病毒为球形，双层衣壳，完整直径~75 nm。纯化病毒经核酸 PAGE 电泳后呈现 10 个核酸节段，并为典型的 3:3:4 排列。哺乳动物呼肠孤病毒(mammalian orthoreovirus，MRV) *L1* 基因保守区 RT-PCR 检测、序列分析及进化树构建结果表明，该病毒株属于 MRV, 且与来源于蝙蝠的呼肠孤病毒分离株 (T3/Bat/Germany/342/08)同源性最高。MRV 是人兽共患病病毒，该实验首次从树鼩体内成功分离到 MRV，对今后研究制定实验树鼩病毒学控制标准具有指导意义，同时为有效预防该病毒在树鼩与人类之间传播提供了实验依据。

关键词：树鼩；呼肠孤病毒；分离；鉴定
中图分类号：Q939.47　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2013)02-0116-05

Isolation and identification of *Tupaia* orthoreovirus

Juan XU[1], Xiao-Yan HUANG[1], Xiao-Fei LI[1], Wen-Guang WANG[1], An-Guo YIN[2], Xue-Shan XIA[2], Xiao-Mei SUN[1,*], Xie-Jie DAI[1,*]

1. *Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College*, *Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases*, *Kunming*　650118, *China;*

2. *Faculty of Life Science and Technology*, *Kunming University of Science and Technology*, *Kunming*　650500, *China*

Abstract: Pathogenic viruses can harm acutely the life and health of laboratory tree shrews acutely; however, few papers exist regarding natural pathogenic virus infection in this species. Six fecal samples obtained from dead tree shrews were collected. The fecal supernatant infected Vero cell line resulted in cytopathic effects (CPE) after 72 h. The CPE included granulating, shrinking, rounding, seining and falling off. Electron microscopy showed the isolation was spherical, double-layered capsid, and about 75 nm in diameter. The purified isolation genome was 10 segments in a typical 3:3:4 arrangements, as shown by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The isolation was confirmed by RT-PCR assays targeting the conserved region of the L1 gene, sequence analysis and reconstruction of a phylogenetic tree. The isolation was a Tupaia Orthoreovirus (TRV), belonging to Mammalian Orthoreovirus (MRV). The obtained strain had the closest phylogenetic relationship to the MRV strain T3/Bat/Germany/342/08. As a zoonotic virus, the novel TRV strain was first isolated from wild tree shrews, which is significant for promoting tree shrew standardization and providing scientific data for preventing zoonotic tree shrew-to-human transmission.

Keywords: Tree shrew: Tupaia reovirus; Isolation; Identification

哺乳动物呼肠孤病毒（mammalian orthoreovirus, MRV) 隶属于呼肠孤病毒科 (Reoviridea)正呼肠孤病毒属 (*Orthoreovirus*)第一亚群(Van Regenmortel et al，2003)。该病毒首次由 Ramos-Alvarez & Sabin 于 1954 年于健康儿童粪便中分离 (Huang et al，1990)。病毒核酸为双链 RNA (dsRNA)，首次证实了 dsRNA 可以作为稳定的生命形态存在于自然界中 (Sabin et al, 1959)。MRV RNA 分 10 个节段，按

收稿日期：2012-12-10；接受日期：2013-01-15
基金项目：国家科技支撑计划 (2009BAI83B02-21；2011BAI15B01-21；2012BAI39B01)；云南省科技计划重点项目(2006PT07-2)；云南省应用基础面上项目(2011FZ211)
*通信作者(Corresponding authors)，E-mail: sxm@imbcams.com.cn，djj@imbcams.com.cn
第一作者简介：徐娟，女，硕士研究生，研究方向：实验动物病毒学；E-mail: xujuan5578@163.com

分子量大小可分成大 (L1，L2，L3)、中 (M1，M2，M3)和小 (S1，S2，S3，S4) 三个类群，分别编码 11 种蛋白，包括 8 种结构蛋白和 3 种非结构蛋白 (McCrae & Joklik，1978)。该病毒宿主范围非常广泛，包括人、鼠、猫、犬、猪、牛 (Zeng et al, 2007)及蝙蝠 (Koh et al, 2012)等多种动物，甚至也在河水、贮存水及污水等中被发现 (Spinner et al, 2001)。虽然该病毒与疾病的确切关系尚未最后确定，但是 MRV 可引起动物严重呼吸窘迫综合症，肺纤维化 (London et al, 2003)和致死性间质性肺炎 (Tillotson & Lemer, 1967)，且对 SARS 病原的相关研究也发现 SARS 的发生可能与呼肠孤病毒的同时感染有关 (Zou et al, 2003)。近几年的相关文献报道，蝙蝠源呼肠孤病毒感染人类后可导致急性上呼吸道疾病 (Chua et al, 2011)。

虽然 MRV 在多种动物中被发现，但是目前尚无其在树鼩 (tree shrew, *Tupaia*)体内的相关报道。为了解树鼩是否自然携带该病毒，2011 年冬，随机抽取 6 份腹泻死亡的野生树鼩粪便标本，并用 Vero 细胞进行病毒分离，首次成功从树鼩体内分离出 MRV。腹泻死亡的野生树鼩发病症状为精神萎靡、身体蜷缩、眼睑和角膜红肿、眼睛分泌物增加、爪子溃烂及血便等。解剖可见肠道出血及肺局部坏死。

树鼩作为新兴的实验动物，需明确其病原菌自然携带情况。本实验证实树鼩自然携带 MRV，为开展和制定树鼩病毒质量控制及标准，实现树鼩实验动物标准化奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料

野生树鼩及 6 份粪便样本均采自云南省昆明市青龙峡地区；Vero 传代细胞 (由中国医学科学院医学生物学研究所免疫室保存；Minimum essential medium (MEM) 液体培养基、1%双抗、谷氨酰胺及碳酸氢钠等来自中国医学科学院医学生物学研究所；标准新生牛血清购自兰州民海生物工程有限公司；DNA 胶回收试剂盒、RT-PCR 试剂盒及病毒 DNA/RNA 提取试剂盒等购自 TaKaRa 生物工程有限公司；PCR 反应引物来自上海生工生物工程有限公司。

1.2　实验方法

六份树鼩粪便样本按 1:5 比例加入 PBS，漩涡震荡混匀，4 000 r/min 离心 10 min，上清经 0.22 μm 微孔滤膜过滤。将处理好的粪便上清接种于 96 孔板 Vero 细胞单层上，每孔接种 30 μL，每份上清接种 16 孔，于 37 ℃、5%CO2 孵箱中吸附 90 min，每隔 15 min 轻轻摇晃 96 孔板，使病毒均匀充分地吸附到细胞上。同时，每个 96 孔板设置 16 孔空白对照。吸弃未吸附的病毒液，加入 MEM 维持液 150 μL，于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养，连续观察细胞病变效应 (cytopathogenic effect，CPE)7 d，并连续盲传三代。取盲传三代病变的 Vero 细胞反复冻融 3 次使细胞完全裂解，于 4 ℃, 4000 r/min 离心 30 min，弃沉淀取上清，然后 4 ℃，9000 r/min 离心 20 min，弃沉淀取上清，于 4 ℃，55000 r/min 离心 180 min，将沉淀用适量 PBS 溶解，4 ℃储存。1%磷钨酸常规染色纯化病毒后，于 Hitachi 透射电镜下观察。

按照病毒 DNA/RNA 提取试剂盒 (TaKaRa 生物工程有限公司)说明书提取纯化病毒核酸。提取的病毒基因组核酸样品按 9:1 的体积与 10× loading buffer 混匀后经核酸聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE)电泳 (积层胶 3.5%，分离胶 10%), 每孔上样 15 μL，100 V 恒压。硝酸银染色观察。

以提取的病毒核酸为模板，对 *L1* 基因进行 PCR 扩增。反应体系条件参照 TaKaRa RT-PCR 试剂盒说明书。根据 *L1* 基因保守部分设计引物, 并参考 Chang et al (2008)的报道(P1：5'-GCATCCATTGTAAATGACGAGTCTG-3'，P2：5'-CTTGAGATTAGCTCTAGCATCAGTTG-3')。扩增产物回收纯化后，送 TaKaRa 生物工程有限公司测序。测序结果通过 NCBI 在 Blast 上进行基因比对，选用同源性较高序列为参考序列。

采用软件 MEGA5.05 中的临位相连法 (neighbor-joining)绘制树鼩呼肠孤病毒 *L1* 序列与参考序列以及代表株 TIL、T2J、T3D 及 NEDV 等 *L1* 序列的系统进化树，并采用自引分析法(Bootstrap, n=1000)进行评估。

2　结　果

2.1　病毒的细胞病变(cytopathic effects，CPE)特征

六份粪便样本在 Vero 细胞中进行病毒分离，得到 1 株 MRV 分离毒株 *Tupaia* orthoreovirus (TRV)。连续盲传 3 代后，出现稳定细胞病变。病毒接种 3 d 后开始产生细胞病变，细胞内颗粒增多、

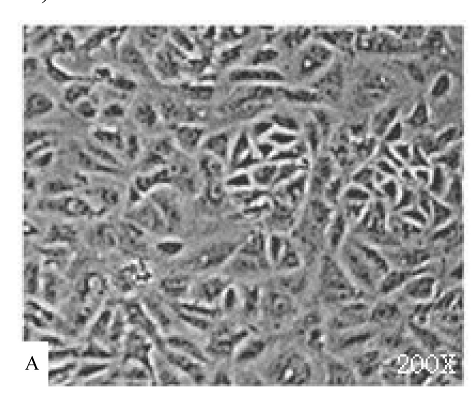
细胞逐渐破碎、固缩变圆、细胞拉网及脱落，正常 Vero 细胞生长良好 (图 1)。

2.2 电镜观察

电镜下，可见大量密集排列的球形病毒颗粒，完整直径~75 nm，内核直径 45~55 nm，完整病毒颗粒以及“空壳颗粒”均可见，双层衣壳，形态疑似呼肠孤病毒 (图 2)。

2.3 核酸聚丙烯酰胺电泳

纯化的病毒 DNA/RNA 核酸 PAGE 电泳结果显示该病毒由 10 个核酸节段组成，存在 3 个明显的节段区，按分子量大小可分成大 (L1，L2，L3)、中 (M1，M2，M3)和小 (S1，S2，S3，S4) 三个类群，且呈现典型的 3:3:4 排列 (图 3)。



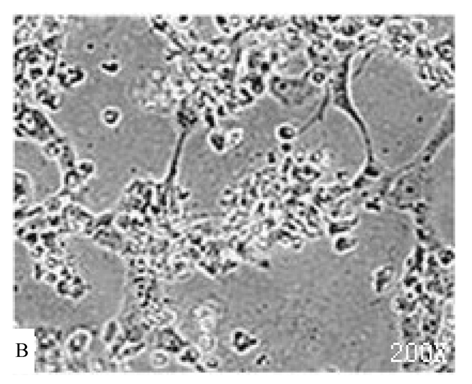


图 1 正常 Vero 细胞及分离毒株 TRV 在 Vero 细胞上的病变

Figure 1 Normal Vero cells and isolation strain TRV on the cells with cytopathic effects

A：正常 Vero 细胞；B：分离毒株 TRV 在 Vero 细胞上的病变。

A: Normal Vero cells; B: Isolation TRV on the Vero cells with cytopathic effects.

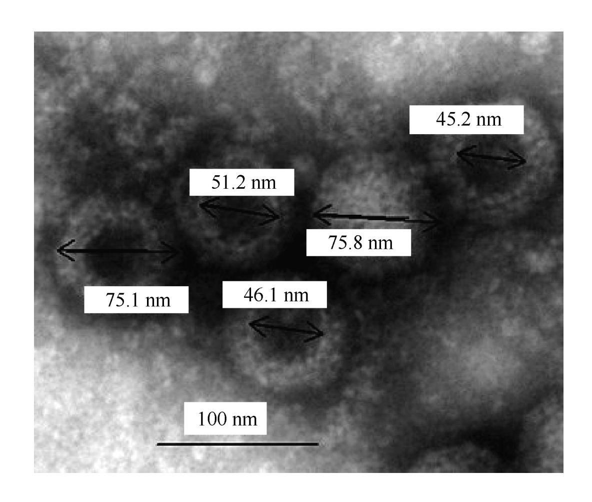


图 2 分离毒株 TRV 电镜观察

Figure 2 Electron microscopic observation of the isolation TRV

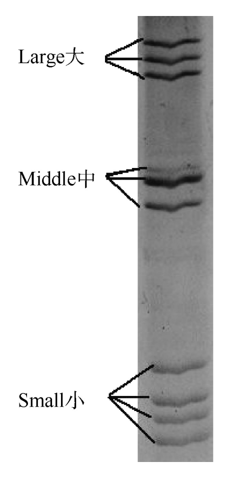


图 3 分离毒株 TRV 基因组节段的 PAGE 电泳图谱

Figure 3 PAGE analysis of the genome segments of the isolation TRV

2.4 RT-PCR 产物

2%琼脂糖凝胶电泳 PCR 扩增产物，目的条带~370 bp，与预期大小一致 (图 4)。

2.5 目的基因序列分析

在 NCBI Blast 上进行的序列对比结果显示目的基因序列与代表株 TIL、T2J、T3D 及 NEDV 等的 *L1* 基因序列的核酸同源性分别为 89%、76%、89%和 88%，与蝙蝠来源的 MRV 分离株 T3Germany342/08(MRV strain T3/Bat/Germany/342/08) 核酸同源性最高，达 96%。进化树上结果表明该病毒与 MRV 同属一支，且与蝙蝠来源的 MRV 同源性最高 (图 5)。

3 讨 论

本实验从树鼩粪便中分离的 TRV 病毒株可致 Vero 细胞逐渐破碎、固缩变圆、拉网及脱落；电镜图显示病毒颗粒为球形，双层衣壳，完整直径~75

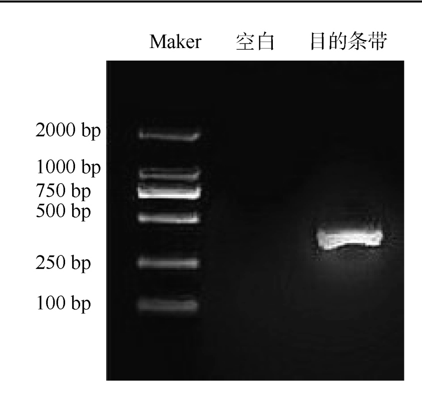


图 4 分离毒株 TRV L1 基因电泳分析
Figure 4 Amplification of the isolation TRV L1 by RT-PCR

nm；纯化病毒核酸 PAGE 胶电泳结果显示，该病毒由 10 个核酸节段组成且为 3:3:4 排列。以上结果均符合已报道的 MRV 的生物学特征。为进一步确定该病毒是否为 MRV，经 MRV *L1* 基因保守区 RT-PCR 扩增、NCBI Blast 核酸序列比对及 MEGA5.05 构建进化树，得出结果：目的基因序列与从大耳蝠 (*P. auritus*) 中分离出的 MRV 分离株 T3Ger342-08 核酸同源性最高，达 96%。从进化树上看，该病毒与 MRV 同属一支，且与从大耳蝠中分离出的 MRV 分离株 T3Ger342-08 同源性最高。从而证实该毒株为 MRV，并初步命名为树鼩呼肠孤病毒 (TRV)。

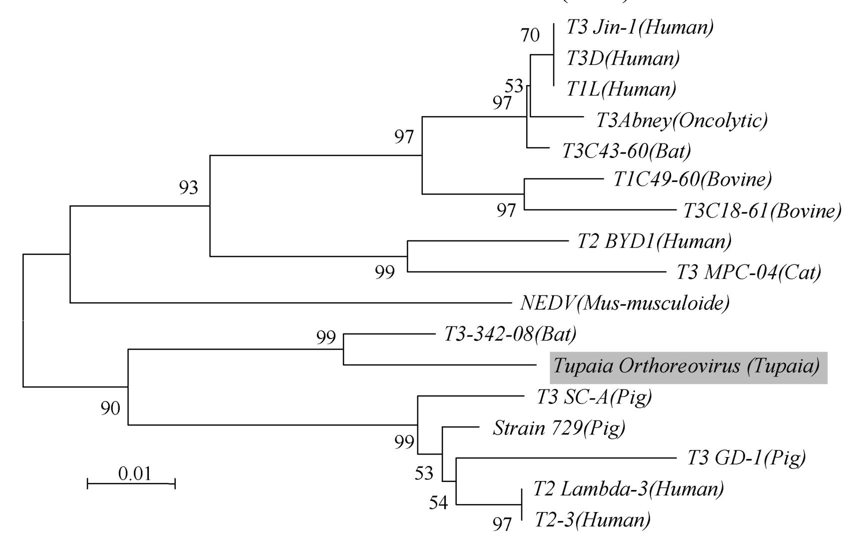


图 5 分离株 *L1* 基因(376 bp)的分子进化树
Figure 5 Phylogenetic tree of *L1* gene sequence (376 bp) of the isolate strain and reference strains

树鼩在分类地位上为攀鼩目(Scandentia)，大耳蝠在分类地位上为翼手目(Chiroptera)小蝙蝠亚目(Microchiroptera)。攀鼩目和翼手目均置于统兽总目(Archonta)。从统兽总目系统进化树上看，攀鼩目和翼手目小蝙蝠亚目的亲缘关系最为接近。树鼩以昆虫为主食，兼食鸟类、兽类和植物果实。大耳蝠的食物为昆虫、鸟类、兽类以及其他蝙蝠。可见，树鼩与大耳蝠的食性相似。由于树鼩和大耳蝠亲缘关系接近且食性相似，可能导致他们感染同一种 MRV。因此，树鼩与大耳蝠较近的亲缘关系和相似的食性可能是 TRV 和 T3Ger342-08 同源性最高的因素之一。

MRV 都有一个共同的 complement-fixing 抗原，用血凝抑制试验和中和试验 (Knipe et al，2001)可分为 4 个血清型 (1、2、3、4 型)，其代表株分别为血清型 1 型(ST1)代表株 T1L (type 1 Lang)株、血清型 2 型(ST2)代表株 T2J (type 2 Jones)株、血清型 3 型(ST3)代表株 T3D (type 3 Dearing)株及血清型 4 型(ST4)代表株 NEDV 株 (Attoui et al，2001)。

Leary et al (2002)报道，MRV *L1* 基因进化与血清型无关。由于该目的基因来源于 MRV *L1* 基因，因此，不能通过该目的基因序列比对及进化树构建等结果对该病毒株进行血清型判定。Cashdollar et al (1985) 报道 *S1* 基因进化与血清型关系密切。下一步欲获得该毒株 *S1* 全基因序列，通过 *S1* 全基因序列比对、进化树构建、血凝抑制试验和中和试验来判定该毒株的血清型。

MRV 具有广泛的致病性，对多种动物胃肠道 (Tyler et al，1998)、上呼吸道 (Majeski et al，2003a)、肺 (Majeski et al，2003b)、心脏 (Debiasi et al，2001)及神经系统 (Tyler et al，2004) 等多种组织均具有一定的致病性，并能在这些发病组织及肿瘤组织中

分离出 MRV。多数人感染 MRV 后无临床症状，少数出现轻微的呼吸道、胃肠道或神经系统疾病，罕见严重并发症甚至死亡。鼠、猪、牛、猴及猫等多种动物感染 MRV 后，同样会出现一定的临床症状。如感染 MRV 1 型的小鼠，通常于感染后 5~7 d 死亡，电镜检测显示神经元及心肌等处存在大量病毒颗粒 (Huang et al, 1990)。以上结果提醒我们应该谨慎对待 MRV。TRV 的首次分离，为国内外开展 TRV 的相关研究如病毒生物学特征、基因组结构和功能、致病机制以及与疾病的关系等奠定了基础。

本实验结果提示树鼩是 MRV 的自然宿主。目前，正在开展树鼩实验动物化的研究，因此树鼩可以作为一种研究 MRV 的良好动物模型。

MRV 是人兽共患病病毒，不仅会影响动物的生命健康、干扰实验结果的可信性，而且可能危害实验动物从业人员的生命健康，为此，建议将 MRV 列为实验树鼩病毒质量控制的检测指标。

参考文献：

Attoui H, Biagini P, Stirling J, Mertens PP, Cantaloube JF, Meyer A, De Micco P, De Lamballerie X. 2001. Sequence characterization of Ndelle virus genome segments 1, 5, 7, 8, and 10: evidence for reassignment to the genus Orthoreovirus, family Reoviridae. *Biochemical and Biophysical Research Communication,* **287**(2): 583-588.

Cashdollar LW, Chmelo RA, Wiener JR, Joklik WK. 1985. Sequences of the S1 genes of the three serotypes of reovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **82**(1): 24-28.

Chang JT, Li X, Zhang YL, Yu L. 2008. Isolation and identification of bovine reovirus from feces of the calves suffered from diarrhea. *Chinese Journal of preventive Veterinary Medicine,* **30**(9):711-715. [常继涛, 李鑫, 张亚科, 于力. 2008. 犊牛腹泻粪样中牛呼肠孤病毒的分离鉴定. 中国预防兽医学报, **30**(9): 711-715.]

Chua KB, Voon K, Yu M, Keniscope C, Rasid KA, Wang LF. 2011. Investigation of a potential zoonotic transmission of orthoreovirus associated with acute influenza-like illness in an adult patient. *PLoS One,* **6**(10): e25434.

Debiasi RL, Edelstein CL, Sherry B, Tyler KL. 2001. Calpain inhibition protects against virus-induced apoptotic myocardia injury. *Journal of Virology,* **75**(1): 351-361.

Huang ZX, Hong T, Sun CB. 1990. Medical Virology Basis, Fundamental Techniques and Methods. Beijing: Science Press, 608-612. [黄祯祥, 洪涛, 孙崇柏. 1990. 医学病毒学基础及实验技术. 北京: 科学出版社, 608-612.]

Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. 2001. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Willians and Wilkins, 2636-2663.

Koh C, Lesnik R, Brinkmann A, Ebinger A, Radonić A, Nitsche A, Mühldorfer K, Wibbelt G, Kurth A. 2012. Isolation and characterization of three mammalian orthoroviruses from European Bats. *PLoS One,* **7**(8): e43106.

Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Wetzel JD, Desai SM, Mushahwar IK, Dermody TS. 2002. Detection of reovirus by reverse transcription-polymerase chain reaction usingprimers corresponding to conserved regions of the viral L1genome segment. *Journal of Virological Methods,* **104**(2): 161-165.

London L, Majeski EI, Paintlia MK, Harley RA, London SD. 2003. Respiratory reovirus 1/L induction of diffuse alveolar damage: a model of acute respiratory distress syndrome. *Experimental and Molecular Pathology,* **72**(1): 24-36.

Majeski EI, Paintlia MK, Lopez AD, Harley RA, London SD, London L. 2003a. Respiratory reovirus 1/L induction of intraluminal fibrosis, a model of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia, is dependent on T lymphocytes. *American Journal of Pathology,* **163**(4): 1467-1479.

Majeski EI, Harley RA, Bellum SC, London SD, London L. 2003b. Differential role for T cells in the development of fibrotic lesions associated with reovirus 1/L-induced bronchiolitis obliterans organizing pneumonia versus Acute Respiratory Distress Syndrome. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology,* **28**(2): 208-217.

McCrae MA, Joklik WK. 1978. The nature of the polypeptide encoded by each of the 10 double-stranded RNA segments of reovirus type 3. *Virology,* **89**(2): 578-593.

Sabin AB. 1959. Reoviruses. *Science,* **130**(3386): 1387-1389.

Spinner ML, Di Giovanni GD. 2001. Detection and identification of mammalian reoviruses in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology,* **67**(7): 3016-3020.

Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, Le M, Karrer FM, Narkewicz MR, Tyson RW, Murphy JR, Low R, Brown WR. 1998. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology,* **27**(6): 1475-1482.

Tyler KL, Barton ES, Ibach ML, Robinson C, Campbell JA, Donnell SM, Valyi-Nagy T, Clarke P, Wetzel JD, Dermody TS. 2004. Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis. *Journal of Infectious Diseases,* **189**(9): 1664-1675.

Tillotson JR, Lemer AM. 1967. Reovirus type 3 associated with fatal pneumonia. *The New England Journal of Medicine,* **276**(19): 1060-1063.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL. 2003. Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 84-96.

Zeng ZY, Guo WZ, Xu ZW, Song ZH. 2007. Isolation, identification of porcine reovirus from diarrhea feces of pigs. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,* **38**(6): 574-580. [曾智勇, 郭万柱, 徐志文, 宋振辉, 殷华平, 王新, 王小玉. 仔猪腹泻粪样中猪呼肠孤病毒的分离鉴定. 畜牧兽医学报, **38**(6): 574-580.)

Zou TT, Tan H, He J, Zhu H, Zhang HJ, Song LH, Huang RT, Duan Q. 2003. Cloning and identification of reovirus isolated from specimens of SARS patients. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences,* **27**(4): 241-243. [左庭婷, 檀华, 何君, 朱虹, 张浩杰, 宋立华, 黄如统, 端青. 2003. 从 SARS 患者标本中分离的呼肠病毒的分离及鉴定. 军事医学科学院院刊, **27**(4): 241-243.]

动　物　学　研　究　2013，Apr. 34(2):121−126　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2013.02121

树鼩 *IL-2* 全长编码序列的克隆及分子特征分析

黄晓燕[1]，李明利[2]，徐　娟[1]，高跃东[3,4]，王文广[1]，殷安国[1]，李晓飞[1]，孙晓梅[1]，夏雪山[5]，代解杰[1,*]

1. 中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所 树鼩种质资源中心，云南省重大传染病疫苗研发重点实验室，云南 昆明 650118；
2. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室，云南 昆明 650223；
3. 中国科学院昆明生物多样性大型仪器区域中心，云南 昆明 650223；
4. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室，云南 昆明 650223；
5. 昆明理工大学 生命科学与技术学院，云南 昆明 650500

摘要：树鼩作为多种人类疾病模型已受到广泛关注，而免疫因子对于树鼩模型评价至关重要，但目前对其白细胞介素-2(IL-2)的研究鲜有报道。该实验以经 ConA (concanavalin)诱导培养的树鼩淋巴细胞总 RNA 为模板，RT-PCR 克隆出 465 bp 的树鼩 *IL-2* 全长编码序列，并采用 Clustal W 软件分析其序列和分子特征。结果表明树鼩 *IL-2* cDNA 编码一个由 154 个氨基酸组成的蛋白质，其 cDNA 及氨基酸序列与人的同源性分别为 93%及 80%，且其整体结构与人 IL-2 相似。MEGA5.0 软件构建的进化树表明，树鼩与人及恒河猴的亲缘关系较近。Pymol 软件对树鼩和人 IL-2 氨基酸序列进行的三维结构模建表明，两者的 IL-2 分子三维空间结构基本相似，表面大部分区域所带电荷相同，但在某些区域差异较大，且树鼩多出一个糖基化位点，这些差异对抗体的结合可能存在影响。该研究为今后树鼩 IL-2 单克隆抗体的制备及功能研究奠定了基础。

关键词：树鼩；IL-2；克隆；结构；功能
中图分类号：Q95-33　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2013)02-0121-06

Analysis of the molecular characteristics and cloning of full-length coding sequence of *Interleukin-2* in tree shrews

Xiao-Yan HUANG[1], Ming-Li LI[2], Juan XU[1], Yue-Dong GAO[3,4], Wen-Guang WANG[1], An-Guo YIN[1], Xiao-Fei LI[1], Xiao-Mei SUN[1], Xue-Shan XIA[5], Jie-Jie DAI[1,*]

1. *Center of Tree Shrew Germplasm Resources , Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases, Kunming* 650118, *China;*
2. *Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Kunming* 650223, *China;*
3. *Kunming Biological Diversity Regional Center of Large Apparatus and Equipment, Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China;*
4. *State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China;*
5. *Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming* 650500, *China*

Abstract: While the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) is an excellent animal model for studying the mechanisms of human diseases, but few studies examine interleukin-2 (IL-2), an important immune factor in disease model evaluation. In this study, a 465 bp of the full-length *IL-2* cDNA encoding sequence was cloned from the RNA of tree shrew spleen lymphocytes, which were then cultivated and stimulated with ConA (concanavalin). Clustal W 2.0 was used to compare and analyze the sequence and molecular characteristics, and establish the similarity of the overall structure of IL-2 between tree shrews and other mammals. The homology of the *IL-2* nucleotide sequence between tree shrews and humans was 93%, and the amino acid homology was 80%. The phylogenetic tree results, derived through the Neighbour-Joining method using MEGA5.0, indicated a close genetic relationship between tree shrews, *Homo sapiens*, and *Macaca mulatta.* The three-dimensional structure analysis showed that the surface charges in most regions

---

收稿日期：2012-12-03；接受日期：2013-01-04
基金项目：国家科技支撑计划项目 (2009BAI83B02-21；2011BAI15B01-21；2012BAI39B01)；云南省科技计划重点项目(2006PT07-2)；云南省应用基础面上项目(2011FZ211)。
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: djj@imbcams.com.cn
第一作者简介：黄晓燕，女，硕士研究生。研究方向：人类疾病动物模型的建立

of tree shrew IL-2 were similar to between tree shrews and humans; however, the N-glycosylation sites and local structures were different, which may affect antibody binding. These results provide a fundamental basis for the future study of IL-2 monoclonal antibody in tree shrews, thereby improving their utility as a model.

Keywords: Tree shrews; Interleukin 2; Cloning; Structure; Function

白细胞介素-2 (Interleukin-2,IL-2)为主要由激活淋巴细胞所产生的Th1型细胞因子，能促进T细胞、NK细胞及B细胞的分化成熟并激活其生物活性，诱导淋巴因子激活杀伤细胞 (LAK)，并通过淋巴因子和天然杀伤细胞破坏肿瘤细胞，以及促进诸多淋巴因子如干扰素及肿瘤坏死因子等的合成、释放及抗体生成，增强机体免疫功能，在抗肿瘤、抗毒素、免疫调节及感染性疾病的治疗等中具有重要作用 (Lenardo, 1991)。IL-2 还可作为免疫佐剂用于某些淋巴组织增生性疾病及癌症的治疗，其拮抗剂可用于抑制器官移植排斥反应 (Theze, 1996; Church, 2003)。人IL-2由位于第4号染色体长臂上的单一非等位基因编码，由153个氨基酸组成，包括20个信号肽 (Gillis et al, 1979)。IL-2与受体结合后发挥作用，其受体由三种肽链α、β和γ参与构成 (Shanafelt, 2000)。IL-2Rα为低亲和力受体，单独与IL-2结合后不参与信号转导。T细胞表面表达由α、β、γ三聚体构成的高亲和力受体参与，NK细胞表面表达由β、γ二聚体构成的中亲和力受体参与 (Voss, 1991)，只有当IL-2和IL-2Rβ及IL-2Rγ结合后，才能通过其胞浆区的异源二聚体和信号旁路的一系列激酶活化发挥有效的信号转导作用。该因子于1976年由Morgan et al报道，并由Taniguchi et al于1983年首次克隆成功。在人类医学方面，重组IL-2在提高免疫抗病机能、抗感染和治疗癌症等方面获得了广泛应用 (Zelus et al，2000)。

树鼩 (*Tupaia belangeri*, tree shrew)是生活在热带和亚热带地区的哺乳纲攀鼩类小型动物，形态酷似松鼠(Cao et al, 2003)，是灵长类动物的近亲(Novacek ,1992; Nie ,2008)。由于树鼩体型小、易驯养、繁殖能力强且饲养管理成本低，作为某些人类重大疾病研究的动物模型, 在医学实验中已被广泛应用。早在1997年，Wang et al就发现树鼩可感染人HCV。Zhao et al (2005)用HCV感染树鼩原代培养肝细胞，结果在细胞培养上清液检出HCV RNA, 说明树鼩肝外可支持HCV复制。Amako et al (2010)用HCV患者血清和HCV全长cDNA重组的病毒颗粒感染树鼩，经过长达3 a的观察发现，HCV在树鼩体内可导致慢性肝炎、肝脂肪变性、肝纤维化、肝硬化结节及肿瘤发生等，表明树鼩可作为模型动物用于研究丙型肝炎发病机制、预防治疗及新药研发。有研究表明，在慢性及重型丙型肝炎感染者血清中IL-2水平明显上升，且其上升幅度与病情轻重和病程长短密切相关 (Bozkaya,2000; Fukuda, 1996; Napoli,1996)。但目前对树鼩IL-2的研究尚属空白, 致使缺乏对树鼩动物模型免疫细胞因子方面的评价指标，因此，阐明树鼩IL-2分子结构和功能的关系，是研究IL-2在丙型肝炎等疾病感染过程中免疫功能的前提。为此，本研究以确定树鼩IL-2完整编码序列为目的，对其进行分子特征分析，为今后制备树鼩 IL-2 单克隆抗体及研究白细胞介素在丙型肝炎中的免疫调节机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

自繁F1代树鼩由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心提供，按实验动物使用的3R原则给予实验动物人道主义关怀。

1.2 树鼩 *IL-2* cDNA 的分子克隆

由于树鼩*IL-2*基因分子序列未见报道，我们首先根据取自NCBI数据库树鼩2倍覆盖率基因组预测序列 (BioProject Accession: PRJNA13971)结合人*IL-2* 编码区设计上、下游引物(上游引物：5'-ATGCACAAAATGCAACTCTTGTCTTG-3',下游引物: 5'-TCAACTCAGTGTTGAAATGATGCTTTG-3')。

无菌采集树鼩外周血2 mL，用Ficoll-PaqueTM PREMIUM (购自GE Healthcare)分离外周血淋巴细胞，经 1640 完全培养基培养及 ConA 诱导 (1640液、胎牛血清购自TaKaRa) 后，收集淋巴细胞，提取细胞总RNA (试剂盒购自Thermo)。将其反转录为cDNA (Revert Aid H Minus First strand cDNA synthesis Kit 购自 Thermo)，利用上述引物进行梯度PCR (Dream Taq Green PCR Master Mix 购自Thermo)，循环参数为：95 ℃ 3 min; 95 ℃ 30 s, 61

℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 35 个循环；72 ℃ 10 min。以树鼩管家基因 GAPDH(Glyceraldehyde-3-phos-phate dehydrogenase) 作为阳性对照，其引物为 5′-CCATCACCATCTTCCAGGAGCGAG-3′和 5′-CAAAGGTGGAGGAGTGGGTGTCG-3′，退火温度为 52 ℃。将胶回收后的 PCR 产物 (胶回收试剂盒购自 TIANGEN) 经 TA 克隆插入 pMD-19T 载体，转化大肠杆菌DH5a感受态细胞，提取质粒经 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ 双酶切鉴定后，由 invitrogen 公司进行双向测序。

1.3 分子特征分析

本文用于参比的核酸序列均来源于 GenBank 数据库，分别采用 DNA MAN 6.0 分析核酸序列、Clustal W 2.0 分析氨基酸序列和 MEGA 5.0 分析树鼩与其他哺乳动物 *IL-2* 之间的亲缘关系，蛋白质三维结构的模建和分析则通过 Discovery Studio 和 PyMOL 完成，信号肽和糖基化位点等则采用在线软件预测 (http://www.cbs.dk/services)。

2 结 果

2.1 树鼩 *IL-2* 全长编码序列扩增

以经 ConA 诱导培养的树鼩淋巴细胞总 RNA 为材料，反转录后由梯度 PCR 克隆出长度 465 bp 的核酸片段。将树鼩 *IL-2* PCR 产物经 T/A 克隆并双向测序，得到树鼩 *IL-2* 全长编码序列（GenBank 登录号：KC170305），开放阅读框长度为 465 bp，编码 154 个氨基酸(图 1)。

```
树鼩 IL-2 序列
ATG CAC AAA ATG CAA CTC TTG TCT TGC ATT GCC TTC ACT CTT GTC CTC GTC ACA
 M   H   K   M   Q   L   L   S   C   I   A   F   T   L   V   L   V   T
AAC AGT GCA CCT ACT CCG GGC GCT ACC GTG GAT ACA AAG GAA CCA CTG GAG CAC
 N   S   A   P   T   P   G   A   T   V   D   T   K   E   P   L   E   H
TTA CTG CTG GAT TTA CAG AAG ATT TTG AAT GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAC CCA
 L   L   L   D   L   Q   K   I   L   N   G   I   N   N   Y   K   N   P
AAG ATG CTC TCC AGG ATG CTC ACA TTT AAA TTT TAT ACA CCC AGA AAG GCC ACA
 K   M   L   S   R   M   L   T   F   K   F   Y   T   P   R   K   A   T
GAA TTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA GAA GAA CTC AAA CCT CTG GAG AAA GTG
 E   L   K   H   L   Q   C   L   E   E   E   L   K   P   L   E   K   V
CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA AAC TTT CAC TTA AAA GAT ACC AGG CAA TTA ATC
 L   N   L   A   Q   S   K   N   F   H   L   K   D   T   R   Q   L   I
AGC AAC ATC AAT GTA ACA GTT CTG GAA TTG AAG GGC TCT GAA ACA TCC GTG TGT
 S   N   I   N   V   T   V   L   E   L   K   G   S   E   T   S   V   C
GAA TAT GAA GAC AGG GTA GCA ACT ATC GTG GAA TTT CTG AAT ATG TGG ATT ACC
 E   Y   E   D   R   V   A   T   I   V   E   F   L   N   M   W   I   T
TTC TGT CAA AGC ATC ATT TCA ACA CTG AGT TGA
 F   C   Q   S   I   I   S   T   L   S   -
```

图 1 树鼩 IL-2 核苷酸序列及对应氨基酸

Figure 1 Nucleotide sequences and corresponding amino acids of tree shrew IL-2

2.2 树鼩 IL-2 氨基酸序列分析

2.2.1 树鼩 IL-2 整体结构与亲缘关系分析

树鼩 IL-2 分子由 154 个氨基酸组成，属于分泌蛋白，具有一个潜在的 N-糖基化位点(NVT)，有 2 个与二硫键形成有关的半胱氨酸，整体结构与人 IL-2 相似 (图 2)。通过对树鼩与其他哺乳动物的 IL-2 核苷酸序列对比发现，其与人及恒河猴的同源性较高 (分别为 91%和 93%)。我们利用 BlastP 及 Clustal W 2.0 对树鼩与人 (NM_00586.3)、恒河猴 (NM_001047130.3)、小鼠(NM_008366.3)、大鼠 (NM_053836.1)、牛(NM_180997.1)及绵羊(NM_001009806.1)等哺乳动物的 IL-2 氨基酸序列进行比较分析 (图 3)，同样发现树鼩 IL-2 氨基酸序列与人及恒河猴同源性较高 (分别为 80%及 79%)，而与大鼠、小鼠的同源性较低 (分别为 61%及 53%)。同时，我们利用 MEGA5.0 软件对树鼩和上述哺乳动物的 IL-2 进行亲缘关系分析并构建进化树，结果发现，树鼩与人及恒河猴处于同一分支，而与大鼠、小鼠距离较远，说明树鼩在进化关系上更接近于人和恒河猴 (图 3)。

2.2.2 树鼩 IL-2 蛋白三维建模及表面电荷分布分析

人 IL-2 主要由五个 α 螺旋结构构成，存在一对二硫键，分别形成于 Cys^{57} 和 Cys^{105} (Suzuki，2010)。通过 Discovery Studio, 我们发现树鼩 IL-2 整体结构与人相似，在其结构域中，能找到相对应的二硫键 (图 4B)。同时，人 IL-2 分子中保守氨基酸残基 Phe^{42}

和 Tyr45 能形成疏水域，也是与 IL-2R α 相结合的区域，Asn88 和 Asp20 之间可形成分子内氢键，也是与 IL-2R β 相结合的区域。其中，人 IL-2 分子中 Asn88 发生突变，会导致 IL-2 从 IL-2-IL-2R β 复合物上脱落，而 Ser127 和 Ser130 残基形成的区域是其与 IL-2R γ 相结合的区域（图 4A），在我们所获得的树鼩 IL-2 结构域中的相应位置也可找到同样的区域（图 4B），推测其具有相对应的功能。

但是，在人 IL-2 结构中未发现 N-糖基化位点，而树鼩 IL-2 结构中有一个 N-糖基化位点。同一参数下的三维结构比较显示，人 IL-2 结构中有 5 个 α 螺旋，而树鼩 IL-2 结构中有 6 个，且某一区域的不规则卷曲也存在差异（图 4C，D）。此外，我们对人与树鼩 IL-2 表面绝对电荷分布的分析表明，两者所带电荷基本相似，正、负电荷基本均等，但在某些区域，树鼩表面正电荷较少（图 4E，F）。树鼩 IL-2 分子中的 N-糖基化位点和表面电荷上与人 IL-2 的差异可能影响其与其他蛋白分子的结合，这可能也解释了我们实验室使用鼠抗人 IL-2 抗体不能与树鼩 IL-2 发生交叉反应的原因。

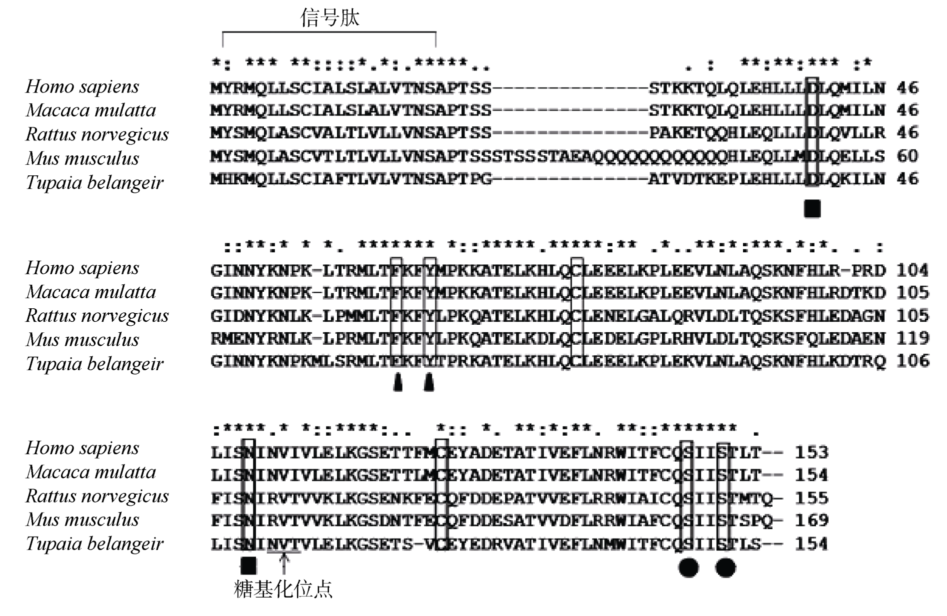


图 2　树鼩与其他哺乳动物 IL-2 氨基酸序列比对分析

Figure 2　Alignment of deduced amino acid sequences of tree shrews IL-2 with those from other mammals

参与二硫键形成的半胱氨酸用方框标注；参与疏水域形成的苯丙氨酸和酪氨酸用方框加 ▲ 标注；参与氢键形成的天冬氨酸和天冬酰胺用方框加 ■ 标注；参与和 IL-2Rγ 相结合的丝氨酸用方框加 ● 标注。

*：序列上 100%的保守区域；　：：保守替换；．：非保守替换。

Cysteine residues involved in disulfide bond formation are marked with boxes; the phenylalanine and tyrosine residues involved in forming hydrophobic region are marked with boxes and ▲; the glutamine and glycine residues involved in intermolecular hydrogen bonds are marked with boxes and ■; the serine resides involved in binding with *IL-2R γ* are marked with boxes and ●; *:100% conserved regions;: : conservative replacement;.: non-conservative replacement.

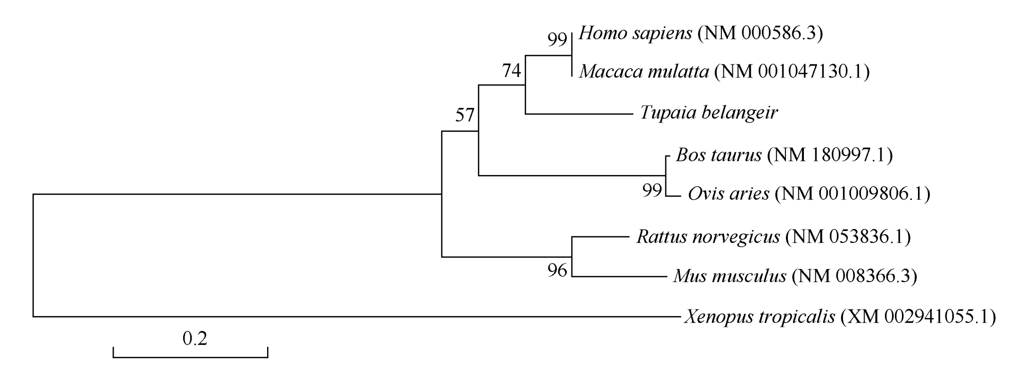


图 3　树鼩和其他哺乳动物 IL-2 之间的亲缘关系 (bootstrap:10 000 replicates; method: Neighbour-Joining)

Figure 3　Phylogenetic relationships of IL-2 chains from tree shrews and other mammals

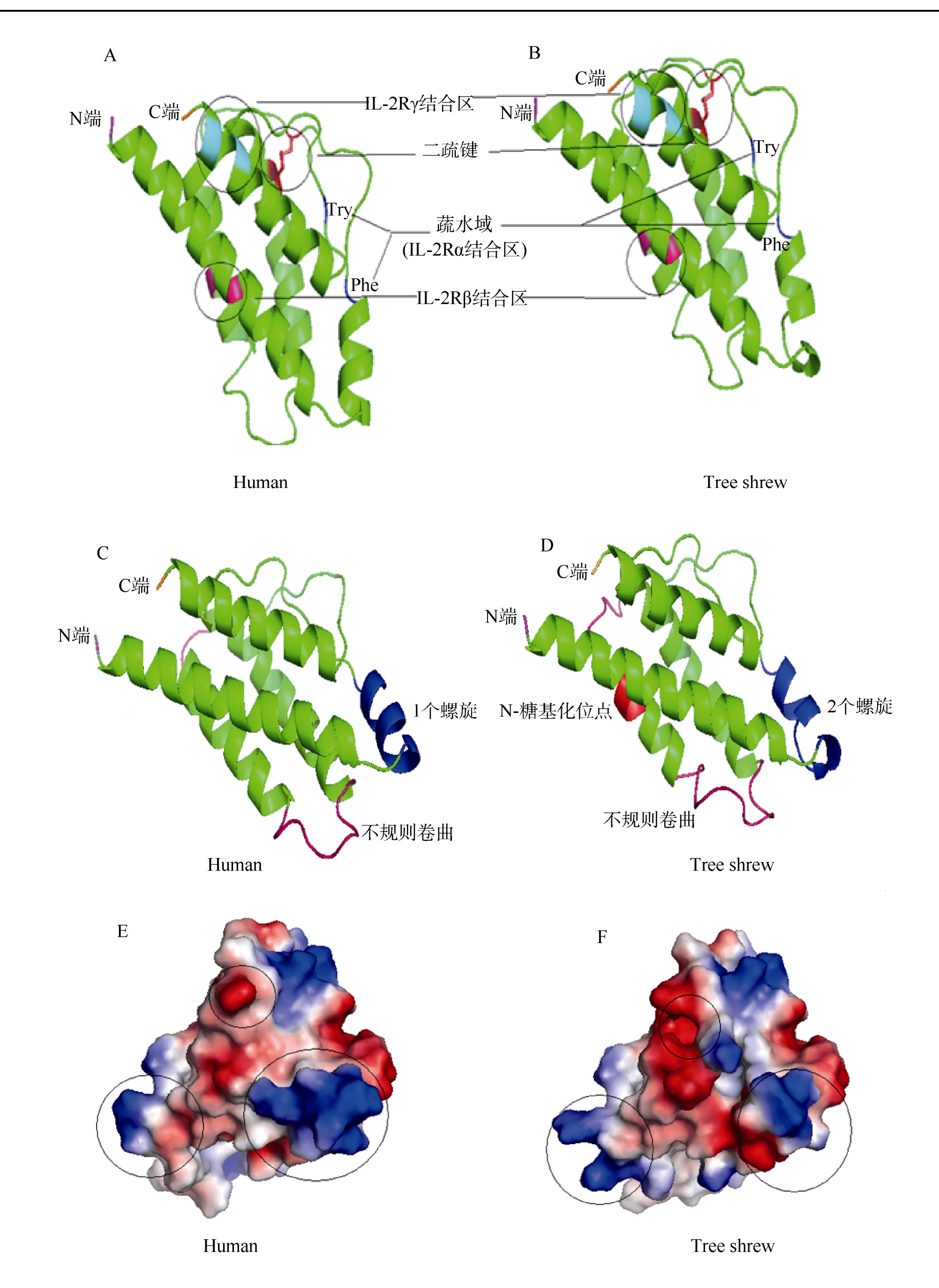


图 4 人 (A、C、E) 和树鼩 (B、D、F) IL-2 蛋白三维结构建模和表面绝对电荷比较

Figure 4 Modeling of three-dimensional structures and surface charges of the domain of human (A,C,E) and tree shrew (B,D,F) IL-2 chains

A、B、C、D：飘带图；E、F：表面绝对电荷分布图；蓝色：正电荷；红色：负电荷。

A，B，C，D: surface views; E, F: surface charges; Blue: positive charges; Red: negative charges.

3 讨 论

本研究确定了树鼩 *IL-2* 基因全长编码序列，并对其蛋白的同源关系与结构域进行了分析。研究表明，树鼩 *IL-2* cDNA 序列和相应的蛋白质结构与其它哺乳动物相近，其 Phe^{42} 和 Tyr^{45} 残基可形成疏水域，Asn^{88} 和 Asp^{20} 之间可形成分子内氢键，根据已报道的人 *IL-2* 结构与功能文献 (Wang et al, 2005)，推测这两个区域分别是与 IL-2Rα 及 IL-2Rβ 相结合的部位，而 Gln^{127}、Ser^{128} 和 Ser^{131} 残基形成的区域是与 IL-2Rγ 相结合的区域，其中，Gln^{127} 与 IL-2Rγ Gln^{127} 及 Asn^{128} 之间可形成分子内氢键。另外，

推测树鼩IL-2分子中 的Cys57和Cys106残基可形成二硫链，这对维持其蛋白结构及实现蛋白功能至关重要。但树鼩 IL-2 分子中具有一个人 IL-2 分子中所不具备的N-糖基化位点，结合糖基化在维持蛋白质与蛋白质之间结合中的作用 (Lis & Sharon, 1993)，推测树鼩 IL-2 与其受体及抗体的结合能力更强。另外，α 螺旋数目和表面电荷分布的明显差异仍有待对树鼩 IL-2 结构与功能特点开展进一步分析。

参考文献：

Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiquchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa M. 2010. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in Tupaia belangeri. *Journal of Virology,* **84**(1): 303-311.

Bozkaya H, Bozdayi AM, Aslan N, Türkay C, Sarioglu M, Çetinkaya H, Akdogan M, Cinar K, Erden E, Kose K, Senturk H, Akkiz H, Karayalcin S, Yurdaydin C, Uzunalimoglu O. 2000. Circulating IL-2 and IL-10 in chronic active hepatitis C with respect to the response to IFN treatment. *Infection,* **28**(5): 309-313.

Cao J, Yang EB, Su JJ, Li Y, Chow P. 2003. The tree shrews: Adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research. *Journal of Medical Primatology,* **32**(3): 123-130.

Church A C. 2003. Clinical advances in therapies targeting the interleukin-2 receptor. *QJM: An International Journal of Medicine,* **96**(2): 91-102.

Fukuda R, Ishimura N, Ishara S, Chowdhury A, Morlyama N, Nogami C, Miyake T, Niigaki M, Tokuda A, Satoh S, Sakai S, Akagi S, Watanabe M, Fukumoto S. 1996. Intrahepatic expression of pro-inflammatory cytotine mRNA and interferon efficacy in chronic hepatitis C. *Liver,* **16**: 390-399.

Gillis S, Union NA, Baker PE, Smith KA. 1979. The in vitro generation and sustained culture of nude mouse cytolytic T-lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine,* 149(6): 1460-1476.

Lenardo M J. 1991. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature,* **353**(6347): 858-861.

Lis H, Sharon N. 1993. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *European Journal of Biochemistry,* 218(1): 1-27.

Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science,* **193**(4257): 1007-1008.

Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GW. 1996. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology,* **24**(4): 759-765.

Novacek MJ. 1992. Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature*, **356**(6365): 121-125.

Nie W, Fu B, O′Brien PC, Wang J, Su W, Tanomtong A, Volobouev V, Ferguson-Smith MA, Yang F. 2008. Flying lemurs—the‘flying tree shrews’? Molecular cytogenetic evidence for a Scandentia-Dermoptera sister clade. *BMC biology*, 6:18.

Shanafelt AB, Lin Y, Shanafelt MC, Forte CP, Dubois-Stringfellow N, Carter C, Gibbons JA, Cheng SL, Delaria KA, Fleischer R, Greve JM, Gundel R, Harris K, Kelly R, Koh B, Li Y, Lantz L, Mak P, Neyer L, Plym MJ, Roczniak S, Serban D, Thrift J, Tsuchiyama L, Wetzel M, Wong M, Zolotorev A. 2000. A T-cell-selective interleukin-2 mutein exhibits potent antitumor activity and is well tolerated in vivo. *Nature Biotechnol,* **18**(11): 1197-1202.

Suzuki S, Konnai S, Okagawa T, Githaka NW, Kariukit E, Gakuyat F, Kanduma E, Shirai T, Ikebuchi R, Ikenaka Y, Ishizuka M, Murata S, Ohashi K. 2012. Molecular cloning and characterization of Th1 and Th2 cytokines of African buffalo(Syncerus Caffer). *International Journal of Immunogenetics,* **39**(2): 170-182.

Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, Hamuro J. 1983. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature,* **302**(5906): 305-310.

Theze J, Alzari PM, Bertoglio J. 1996. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunology Today,* **17**(10): 481-486.

Voss SD, Sondel PM, Robb RJ. 1992. Characterization of the interleukin-2 receptors(IL-2R) expressed on human nature killer cells activated in vivo by IL-2: association of the p64 IL-2R gamma chain with the IL-2R beta chain in functional intermediate-affinity IL-2R. *The Journal of Experimental Medicine,* **176**(2): 531-541.

Wang HP, Zhou YX, Yao ZQ, Hong S, Li GY. 1997. The preliminary study of infection of major tupaia with hepatitis C virus. *Journal of the Fourth Military Medical University,* **18**(4): 375-376. [王海平, 周永兴, 姚志强, 洪沙, 李光玉. 1997. 成年树鼩实验感染丙型肝炎病毒的初步研究. 第四军医大学学报, **18**(4): 375-376]

Wang X, Rickert M, Garcia KC. 2005. Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its α, β and γc receptors. *Science,* **310**(5751): 1159-1163.

Zelus D, Robinson-Rechavi M, Delacre M, Auriault C, Laudet V. 2000. Fast evolution of interleukin-2 in mammals and positive in ruminants. *Journal of Molecular Evolution,* **51**(3): 234-244.

Zhao XP, Tian ZF, Chen YC, Yang C, Tian DY, Yang DL, Hao LJ. 2005. Infection of tupaia hepatocytes with hepatitis C virus in vitro. *Chinese Journal of Hepatology,* **13**(11): 805-807. [赵西平, 田展飞, 陈义春, 杨春, 田德英, 杨东亮, 郝连杰. 2005. 丙型肝炎病毒体外可感染树鼩肝细胞. 中华肝脏病杂志, **13**(11): 805-807.

动 物 学 研 究 2013，Apr. 34(2): 127−131 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2013.02127

中缅树鼩三个多潜能基因 cDNA 片段的克隆和序列分析

王彩云 [1,#]，马云瀚 [2,#]，何大健 [3]，杨世华 [1,*]

1. 昆明理工大学 生命科学与技术学院，云南 昆明 650500；
2. 昆明理工大学 医学院，云南 昆明 650500；
3. 中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明 650223

摘要：该实验从中缅树鼩 (*Tupaia belangeri*) 组织中成功克隆 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 基因的部分序列，长度分别为 382、612 和 485 bp，分别编码 127、204 和 161 个氨基酸。树鼩的 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 序列与人相应序列的相似性分别为 89%、98% 和 89%。将树鼩 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 基因分别与其他物种的这 3 个基因进行系统进化分析，发现 *Klf4* 和 *Sox2* 基因所构建的系统进化树结构较为一致，但与 *c-Myc* 所构建的系统进化树有所不同，表明这些基因在进化上存在差异。*Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 基因的克隆为进一步研究其功能奠定了基础。

关键词：树鼩；*Klf4*；*Sox2*；*c-Myc*；序列分析
中图分类号：Q75 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2013)02-0127-05

cDNA cloning and sequence analysis of pluripotency genes in tree shrews (*Tupaia belangeri*)

Cai-Yun WANG [1,#], Yun-Han MA [2,#], Da-Jian HE [3], Shi-Hua YANG [1,*]

1. *Faculty of Life Science and Technology*, *Kunming* 650500, *China;*
2. *Faculty of Medical*, *Kunming University of Science and Technology*, *Yunnan Kunming* 650500, *China;*
3. *Kunming Institute of Zoology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Yunnan Kunming* 650223, *China*

Abstract: In this paper, partial sequences of the tree shrew (*Tupaia belangeri*) *Klf4*, *Sox2*, and *c-Myc* genes were cloned and sequenced, which were 382, 612, and 485 bp in length and encoded 127, 204, and 161 amino acids, respectively. Whereas, their cDNA sequence identities with those of human were 89%, 98%, and 89%, respectively. Their phylogenetic tree results indicated different topologies and suggested individual evolutional pathways. These results can facilitate further functional studies.

Keywords: Tree shrew; *Klf4*; *Sox2*; *c-Myc*; Sequence analysis

树鼩 (tree shrews，*Tupaia belangeri*)被认为是最接近于灵长类的小型哺乳类动物，已被广泛应用于医学和生物学实验研究中 (Xu et al，2013)。诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSc)是指转录因子 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 等促使体细胞重编程 (Takahashi & Yamanaka，2006; Takahashi et al，2007)，使其成为具有多潜能性的干细胞。因为 iPS 细胞能形成嵌合体动物而体现其全能性，掀起了人类再生医学研究的热潮。*Sox2* 基因所编码的转录因子对于维持胚胎神经嵴干细胞多能性具有重要作用 (Laga et al，2010)。由 *Oct4* 和 *Sox2* 基因组成的调控复合物控制基因表达对于维持早期细胞发育非常重要 (Okumura-Nakanishi et al，2005)。*C-Myc* 是一种原癌基因，失去该基因后细胞的重编程进度及效率均会显著降低 (Shi et al，2008)。*Klf4* 能够连接 Nanog 的启动子区域并直接调控其表达，因此，在防止胚胎干细胞（embryonic stem cells，ESCs）的分化中起重要作用，同时，它也是维护细胞自我更新和保持多能性的重要基因 (Zhang et al，2010)。

小鼠及人类等的体细胞均可通过转录因子

收稿日期：2012-12-17；接受日期：2013-01-16
基金项目：科技部重大科学研究计划重大科学问题导向项目（ 2012CBA01300,杨世华），教育部“新世纪国家优秀人才”支持计划项目，国家自然科学基金项目(31071279，30871232)，云南省科技创新人才计划项目(2011CI009)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: yshhm@163.com
#共同第一作者(Authors contributed equally to the work)

Klf4、*Sox2*、*c-Myc* 及 *Oct4* 等诱导成为多能干细胞 (Takahashi & Yamanaka，2006; Takahashi et al，2007)。但树鼩多潜能转录因子的核酸序列至今未见报道，影响了树鼩 iPSc 的研究，因此，本研究克隆并解析了树鼩的多潜能因子 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 等，为研究树鼩 iPSc 及基因转录分析提供了重要数据。

1　材料和方法

1.1　实验材料

选取健康成体树鼩的骨髓和妊娠期～30 d 孕体的不同组织器官 (肝脏、肠及大脑等)。

1.2　简并引物设计

通过 GenBank 公布的人(NM004235；NM002467；NM003106)、猕猴(NM001142793；NM001142873；NM001142940)、牛(NM001105385；NM001046074；BC133458)及猪等(EU669075；FJ882404；EU503117)的 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 基因序列，用 Primier 5.0 软件设计简并引物 (Table 1)。

表 1　*Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 简并引物

Table 1　*Klf4,Sox2* and *c - Myc* degenerate primer

基因名称 Gene name	引物 Primer
Sox2	正向引物 forward primer：5'-CGAGCGCTGCACATGAAGGA-3'
	反向引物 reverse primer：5'-GCCGCTCTGGTAGTGCTGGG-3'
c-Myc	正向引物 forward primer：5'-GCTCCACCTCCAGCYTGTACCT-3'
	反向引物 reverse primer：5'-GACYCTGMCACTGTCCAACTTRG-3'
Klf4	正向引物 forward primer：5'-GGCGGGAAGGGAGAAGACMC-3'
	反向引物 reverse primer：5'-CCCGSATYGGATAGSTGAAG-3'

1.3　树鼩总 RNA 提取及简并 PCR 法扩增目的基因

使用 RNA prep pure tissue kit (TIANGEN 公司) 提取树鼩组织总 RNA，提取方法按试剂盒说明书进行。

反转录反应实验按反转录试剂盒 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara 公司)说明书进行。PCR 反应总体系为 25 μL：DNA 2 μL，10× 缓冲液 2.5 μL，dNTPs 2 μL，上、下游引物各 1 μL，easy TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL，ddH2O 16.3 μL。PCR 扩增程序：95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 45 s，58～60 ℃退火 40 s，72 ℃延伸 50 s，共 35 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。

PCR 产物通过 1%的琼脂糖凝胶电泳分离并纯化，再将 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 纯化产物与 pMD18T 载体连接，并转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。37 ℃转化株在提供 X-gal/IPTG 的 LB 培养基中孵育 12 h。蓝白斑筛选阳性菌落，且每个基因挑取 5 个不同的阳性菌落 37 ℃摇床培养 12 h，挑取菌斑用于基因测序。测序由上海生工测序公司完成。

1.4　序列分析

所得序列经校对后，进入 GenBank 数据库进行 Blast 分析，同时通过在线软件 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi)对获得的树鼩 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 的部分序列进行氨基酸推导。然后从 GenBank 中下载不同物种的 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 基因，利用 MEGALIGN 对序列进行排列，并应用 Mega5.0 软件的邻接法(NJ)构建基因系统进化树。NJ 分析采用 Kimura two-parameter 距离法，分支树可信度测试使用自展法 (Bootstrap)检验，经 1 000 次重复抽样检验得到分支树节点的支持率。系统进化树构建所用序列见图 4、图 5 和图 6。

2　结　果

2.1　树鼩总 RNA 的获取

树鼩总 RNA 采用琼脂糖凝胶电泳法验证质量(图 1)，所选取的两个样品的 rRNA 三条带清晰，表明提取的 RNA 具有良好的完整性，并适用于后续实验。

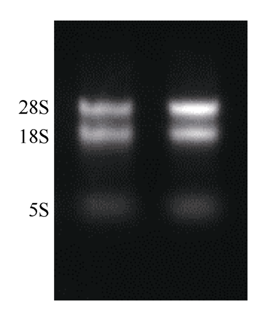


图 1　树鼩组织总 RNA

Figure 1　Total RNA extracted from tissues of tree shrews

2.2　目的片段的检测

RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳显示，目标条带与预期目的基因大小一致(图 2)。

2.3　树鼩 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 基因部分片段的序列分析

获得的 *Sox2*、*c-Myc* 和 *Klf4* 部分序列长度 [GenBank 登录号分别为 *Klf4* (K1 KC480548)、*Sox2* (S1 KC480549) 和 *c-Myc* (C1 KC480547)]与预

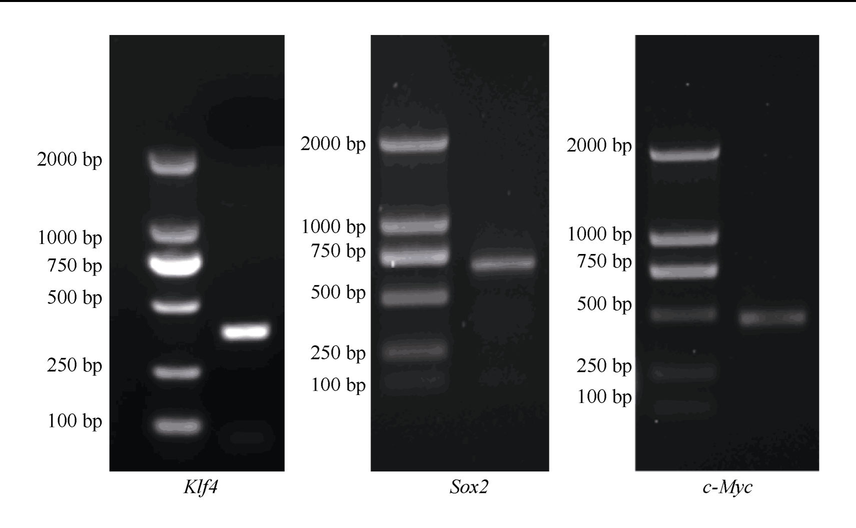


图 2　树鼩 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 的 RT-PCR 扩增结果
Figure 2　Amplification results of *Klf4*, *Sox2*, and *c-Myc* genes by RT-PCR

期结果一致，分别为 612、485 和 382 bp (测序结果及推导的氨基酸序列见图 3)。树鼩 *Klf4* 部分序列与人 (*Homo sapiens*)、猕猴 (*Macaca mulatta*)、牛 (*Bos taurus*)、猪 (*Sus scrofa*)以及鼠 (*Mus musculus*) 等相应序列的相似性分别为 89%、90%、90%、89%和 86%，编码 127 个氨基酸；*Sox2* 部分序列与人、猕猴、牛、猪及鼠等相应序列的相似性分别为 98%、97%、96%、97%和 95%，编码 204 个氨基酸，且该氨基酸序列与猕猴的 *Sox2* 氨基酸序列仅存在 1 个氨基酸的差别，相似性高达 99%；*c-Myc* 部分序列与人、猕猴、牛、猪及鼠等相应序列的相似性分别为 89%、89%、90%、92%和 87%，编码 161 个氨基酸。

2.4　树鼩 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 基因部分片段的进化分析

在基于 *Klf4* 部分序列以及推导氨基酸序列构建的系统树中 (图 4)，各分支具有较高的置信度，说明这些动物之间的系统进化关系具有较高可信度。由系统树可见，人 (*Homo sapiens*)、黑猩猩 (*Pan troglodytes*)和猕猴 (*Macaca mulatta*)等聚为一类(灵长类)；牛 (*Bos taurus*)、羊 (*Ovis aries*)和猪 (*Sus scrofa*)等聚为一类 (偶蹄类)；小家鼠(*Mus_musculus*)和褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)等聚为一类(啮齿类)。其中树鼩以较高的支持率与灵长类聚为一支。同样，在基于 *Sox2* 部分序列构建的系统树中 (图 5)，各类动物聚类情况与 *Klf4* 类似，树鼩同样与灵长类聚为一支，但支持率有所降低。由于不同类群动物的 *Sox2* 基因推导的氨基酸同源性非常高，系统分析时各分支支持率很低 (结果未给出)，因而未给出其氨基酸序列构建的系统树。在以 *c-Myc* 部分序列以及推导氨基酸序列构建的系统树中 (图 6)，灵长类、偶蹄类和啮齿类等虽各聚为一支，但树鼩以较高的支持率与偶蹄类动物聚为一支。

3　讨　论

树鼩的分类学及生物学特征研究较为广泛，已证明其许多生物学特性可以作为人类疾病模型的重要材料 (Xu et al，2013；Ping et al，2012；Zhang et al，2012)。本研究结果为进一步探索树鼩的生殖工程和疾病模型提供了重要数据。

人(*Homo sapiens*)的 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 全长分别为 2 949、2 520 和 2 379 bp，本研究获得的 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 部分序列长度分别为 382、612 和 485 bp，分别对应于人相应基因的 675~1 060 bp、729~1340 bp 和 1082~1566 bp。基于 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 部分序列的进化分析支持偶蹄动物与灵长动物的亲缘关系，较与啮齿动物的亲缘关系更为接近，与动物种系进化关系相一致。在基于 *Klf4* 和 *Sox2* 部分序列构建的基因树中，树鼩与灵长类动物的亲缘关系更近，而与偶蹄动物和啮齿动物的亲缘关系较远。但在 *c-Myc* 基因系统进化树中，树鼩与偶蹄动物的亲缘关系更近。这说明 *Klf4*、*Sox2* 与 *c-Myc* 基因可能在进化方式或速度上存在一定的差异。另外，由于本研究中暂未获得这几个基因的全长序列而仅克隆了较为保守的部分序列，利用部分

```
 ggcgggaagggagaagaccctgcgcccggcaggtgtcccgaataaccgctggcgggaggagctctcg
   A  G  R  E  K  T  L  R  P  A  G  V  P  N  N  R  W  R  E  E  L  S
cacatgaagcgacttcccccggtgctccctggccgcccttacgacctggcggcggcgacagtggccaca
 H  M  K  R  L  P  P  V  L  P  G  R  P  Y  D  L  A  A  A  T  V  A  T
gacctggagaacggaggagccggcgcggcttgcggcggtaacaacccggcgctcttaccccggagagaa
 D  L  E  N  G  G  A  G  A  A  C  G  G  N  N  P  A  L  L  P  R  R  E
acggaggagttcaacgagctcctggacctggactttatcctctccaactcgctgtcccatccggagtcg
 T  E  E  F  N  E  L  L  D  L  D  F  I  L  S  N  S  L  S  H  P  E  S
gtgcccccaccgtgtcctcgtcggcgtcagcctcgtcctcgtcctccccgtcgagcagcggccctacc
 V  P  P  T  V  S  S  S  A  S  A  S  S  S  S  S  P  S  S  S  G  P  T
agcgctccctccacctgcagcttcagctatccgatgcgg
 S  A  P  S  T  C  S  F  S  Y  P  M  R                            Klf4

cgagcgctgcacatgaaggagcacccggattataaataccggccccggcggaaaaccaagacgctc
 R  A  L  H  M  K  E  H  P  D  Y  K  Y  R  P  R  R  K  T  K  T  L
atgaagaaggataagtacactctgcccggcgggctgctggcccccggcggcaacagcatggcgagc
 M  K  K  D  K  Y  T  L  P  G  G  L  L  A  P  G  G  N  S  M  A  S
ggggtcggggtgggcgccggcctgggcgcgggcgtgaaccagcgcatggacagctacgcgcacatg
 G  V  G  V  G  A  G  L  G  A  G  V  N  Q  R  M  D  S  Y  A  H  M
aacggctggagcaacggcagctacagcatgatgcaggaccagctgggctatccgcagcacccgggc
 N  G  W  S  N  G  S  Y  S  M  M  Q  D  Q  L  G  Y  P  Q  H  P  G
ctcaacgcgcacggcgcggcgcagatgcagcccatgcaccgctacgacgtgagcgccctgcagtac
 L  N  A  H  G  A  A  Q  M  Q  P  M  H  R  Y  D  V  S  A  L  Q  Y
aactccatgagcagctcgcagacctacatgaacggctcgcccacctacagcgtgtcctactcgcag
 N  S  M  S  S  S  Q  T  Y  M  N  G  S  P  T  Y  S  V  S  Y  S  Q
cagggcacccccggcatggcgctcggctccatgggctcggtggtcaagtccgaggccagctccggc
 Q  G  T  P  G  M  A  L  G  S  M  G  S  V  V  K  S  E  A  S  S  G
ccccctgtggttacctcttcctcccactccagggcgccctgccaggccggggacctccgggacatg
 P  P  V  V  T  S  S  S  H  S  R  A  P  C  Q  A  G  D  L  R  D  M
atcagcatgtacctccccggcgccgaggtgccggagcccgccgcccccagcagacttcacatgtcc
 I  S  M  Y  L  P  G  A  E  V  P  E  P  A  A  P  S  R  L  H  M  S
cagcactaccagagcggc
 Q  H  Y  Q  S  G                                              Sox2

 gctccacctccagcttgtacctgcaggacctgagcgccgccgcctccgagtgcatcgacccctcggta
   S  T  S  S  L  Y  L  Q  D  L  S  A  A  A  S  E  C  I  D  P  S  V
gtcttcccctacccgctcaacgacggcagctcgcccaagccctgcgcctcgccggactccaccgccttc
 V  F  P  Y  P  L  N  D  G  S  S  P  K  P  C  A  S  P  D  S  T  A  F
tccccgtcctcggactccctgctctcctccaccgagtcctctccgcgggccagccccgagcccctggcg
 S  P  S  S  D  S  L  L  S  S  T  E  S  S  P  R  A  S  P  E  P  L  A
ctccacgaggagacacctcccaccaccagcagcgactctgaggaagaccaagaggatgaggaagaaatt
 L  H  E  E  T  P  P  T  T  S  S  D  S  E  E  D  Q  E  D  E  E  E  I
gatgtcgtttctgtagaaaagaggcagccccctaccaaaaggtcggaatcggggtcaccctccactgga
 D  V  V  S  V  E  K  R  Q  P  P  T  K  R  S  E  S  G  S  P  S  T  G
ggccacagcaaacccccctcacagtccactggttctcaagaggtgccatgtctccacccatcagcacaat
 G  H  S  K  P  P  H  S  P  L  V  L  K  R  C  H  V  S  T  H  Q  H  N
tacgccgcaccaccctccaccaggaaggactacccagctgccaagagggccaagttggacagtggcaga
 Y  A  A  P  P  S  T  R  K  D  Y  P  A  A  K  R  A  K  L  D  S  G  R
gtc
 V                                                             c-Myc
```

图 3　树鼩 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 基因部分序列及推导的氨基酸序列

Figure 3　Partial nucleotide and predicted amino acid sequences of *Klf4*, *Sox2*, and *c-Myc* genes in tree shrews

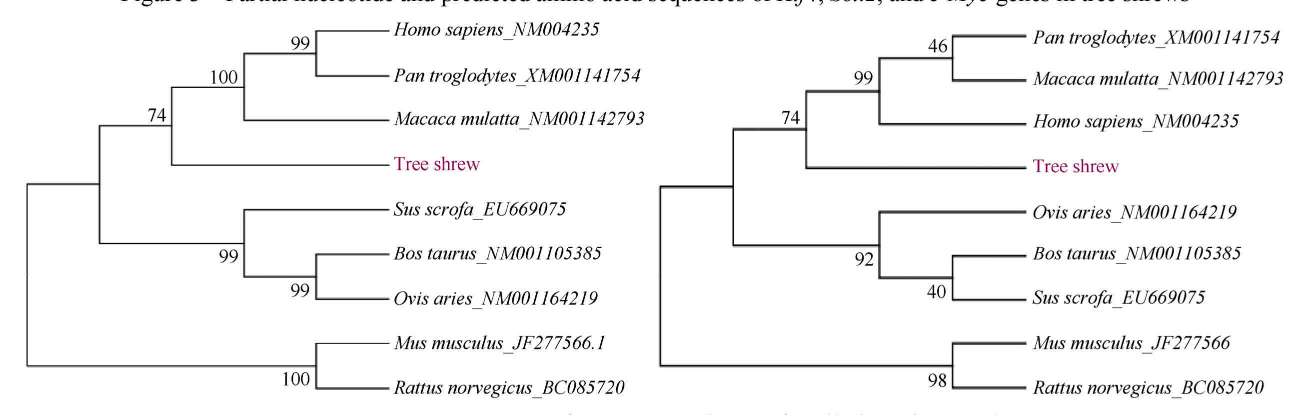


图 4　基于 *Klf4* 基因部分序列以及推导氨基酸序列构建的系统进化树

Figure 4　Phylogenetic tree of nucleotide sequences (a) and deduced amino acid sequences (b) of the *Klf4* gene

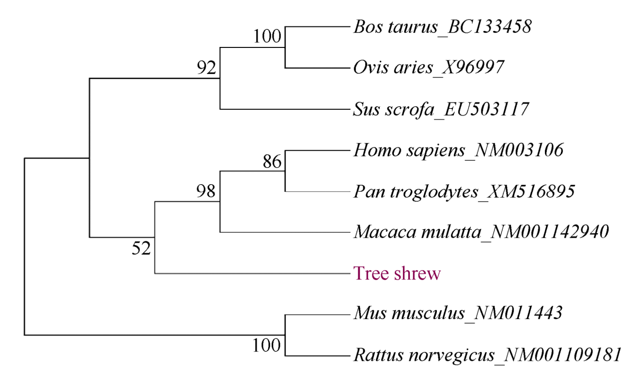
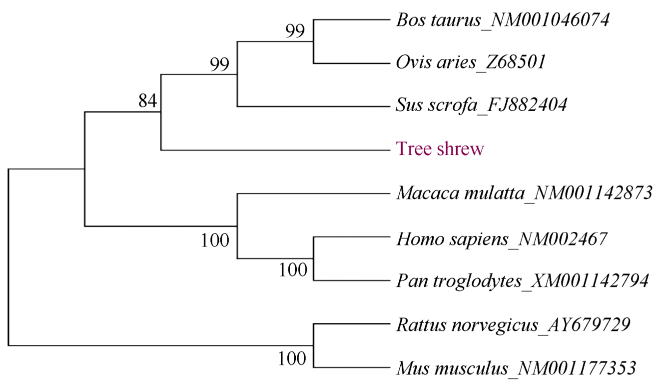


图 5　基于 *Sox2* 基因部分序列构建的系统进化树
Figure 5　Phylogenetic tree based on partial nucleotide of the *Sox2* gene

序列进行进化分析，可能不能很准确反应这些类群的真实亲缘关系。

由于目前 GenBank 数据库中尚未收录树鼩的 *Klf4* 和 *Sox2* 基因序列，在一定程度上限制了树鼩的分子生物学研究。本研究采用简并 PCR 扩增，成功克隆了树鼩 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 基因 cDNA 的部分序列，为克隆这三种基因的全长提供了良好基础。

另外，以往的研究认为 iPS 在小鼠疾病模型及胚胎干细胞研究中具有相似的功能 (Hanna et al，2007)。因此，我们假设可以通过导入树鼩的 3 种基因 *Sox2*、*c-Myc* 和 *Klf4* 来诱导树鼩多潜能干细胞。推测该模型的评估治疗效果较小鼠模型将更加可行。目前关于树鼩的这 3 个基因功能的研究还未见报道，本研究首次对树鼩 *Klf4*、*Sox2* 和 *c-Myc* 三个基因 cDNA 部分片段进行了克隆和序列分析，旨在为进一步研究诱导树鼩多潜能干细胞奠定基础。



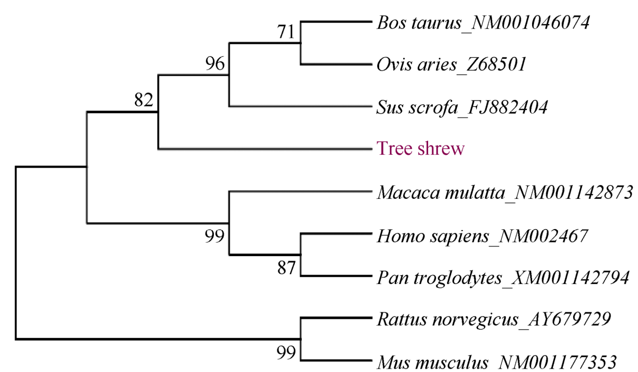


图 6　基于 *c-Myc* 基因部分序列以及推导氨基酸序列构建的系统进化树
Figure 6　Phylogenetic tree of nucleotide sequences (a) and deduced amino acid sequences (b) of the *c-Myc* gene

参考文献：

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science,* **318**(5858): 1920-1923.

Laga AC, Lai CY, Zhan Q, Huang SJ, Velazquez EF, Yang QH, Hsu MY, Murphy GF. 2010. Expression of the embryonic stem cell transcription factor SOX2 in human skin: relevance to melanocyte and merkel cell biology. *The American Journal of Pathology,* **176**(2): 903-913.

Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, Ishikawa F. 2005. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry,* **280**(7): 5307-5317.

Ping SH, Wang CY, Tang WR, Luo Y, Yang SH. 2012. Effects of some extenders and monoamines on sperm cryopreservation in tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Zoological Research,* **33**(1): 19-28. [平述煌，王彩云，唐文如，罗瑛，杨世华. 2012. 几种冷冻稀释液与单胺类防冻剂对中缅树鼩精子冷冻存活率的影响. 动物学研究, **33**(1): 19-28.]

Shi Y, Desponts C, Do JT, Hahm HS, Scholer HR, Ding S. 2008. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell,* **3**(5): 568-574.

Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**(4): 663-676.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**(5): 861-872.

Xu L, Zhang Y, Liang B, Lv LB, Chen CS, Chen YB, Zhou JM, Yao YG. 2013. Tree shrews under the sp ot light: emerging model of human diseases. *Zoological Research,* **34**(2): 59-69. [徐林，张云，梁斌，吕龙宝，陈策实，陈勇彬，周巨民，姚永刚. 2013. 树鼩实验动物和人类疾病的树鼩模型研究概述. 动物学研究, **34**(2): 59-69.]

Zhang PL, Andrianakos R, Yang Y, Liu CM, Lu WG. 2010. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *Cell,* **126**(4): 663-676.

Zhang YX, Ping SH, Yang SH. 2012. Morphological characteristics and cryodamage of Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) sperm. *Zoologcial Research,* **33**(1): 29-36. [张远旭，平述煌，杨世华. 2012. 中缅树鼩精子形态特征及冷冻损伤. 动物学研究, **33**(1): 29-36.]

动 物 学 研 究 2013，Apr. 34(2): 132−138 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2013.02132

树鼩解剖数据的测定与分析

李 波[1,2]，张荣平[1]，李进涛[1,2]，何保丽[1,2]，郑 红[1,2]，王利梅[1]，角建林[1,*]

1. 昆明医科大学 实验动物学部，云南 昆明 650031；
2. 扬州大学 兽医学院，江苏 扬州 225009

摘要：解剖数据是实验动物主要的生物学特性指标。该文对实验室驯养树鼩 (7～9 月龄)的体尺、骨骼、乳头、肠道及脏器重量与系数等解剖学数据进行了测定与分析。31 项解剖数据测量结果显示雌、雄个体间体高、右耳宽、回肠及结肠差异显著 (P<0.05)，体斜长、胸深、躯干长、左右两前肢长、右后肢长、左右两侧耳长、左耳宽、龙骨长、左右两侧胫长、十二指肠及空肠长等差异极显著 (P<0.01)。以体长为因变量，尾长、躯干长、左前肢长、右前肢长、左后肢长及右后肢长等为自变量作逐步回归分析，回归方程为：体长=13.90+尾长×0.16。37 项脏器及系数测定结果：雌雄间比较，体重、心、肺、脾、左肾、右肾、膀胱、左海马、右海马、左颌下腺、左甲状腺、右甲状腺重量差异极显著(P<0.01)。小肠、右颌下腺、左肾上腺之间差异显著(P<0.05)；心、肺、胃、膀胱、小肠、大肠、脑、右海马、左肾上腺系数雌雄间差异极显著 (P<0.01)。右肾、左海马、左颌下腺、右肾上腺、左右两侧甲状腺系数之间达到了显著性水平 (P<0.05)。以动物体重为因变量，以主要脏器指标：心脏、肺、肝、脾、左肾、右肾、脑为自变量，作逐步回归分析，回归方程为：体重=62.73+左肾×79.213+心脏×24.09。实验室驯养树鼩不同性别对体尺、脏器及系数、肠道等解剖数据有一定影响，为树鼩实验动物化及人类疾病动物模型研究提供基础数据。

关键词：树鼩；解剖数据；脏器重量；脏器系数
中图分类号：Q4 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2013)02-0132-07

Measurement and analysis of anatomical parameter values in tree shrews

Bo LI[1,2], Rong-Ping ZHANG [1], Jin-Tao LI [1,2], Bao-Li HE[1,2], Hong ZHEN[1,2], Li-Mei WANG[1], Jian-Lin JIAO[1,*]

1. *Laboratory Animal Center of Kunming Medical University*, *Kunming* 650031, *China*;
2. *College of Veterinary Medicine*, *Yangzhou University*, *Yangzhou* 225009, *China*

Abstract: Anatomical parameter values in tree shrews are major biological characteristic indicators in laboratory animals. Body size, bones and mammilla, organ weights, coefficient intestinal canal and other anatomical data were measured and analyzed in laboratory domesticated tree shrews (7 to 9 months of age). Measurement of 31 anatomical parameters showed that body height, width of the right ear, ileum and colon had significant differences between males and females (P<0.05). Highly significant differences were also found in body slanting length, chest depth, torso length, left and right forelimb length, right hind limb length, left and right ear length, left ear width, keel bone length, left and right tibia length, duodenum and jejunum (P<0.01). With body length as the dependent variable, and tail length, torso length, right and left forelimb length, and left and right hind limb length as independent variables for stepwise regression analysis, the regression equation for body length = 13.90 + tail length × 0.16. The results of 37 organs weights between female and male tree shrews showed very significant differences (P<0.01) for weight of heart, lungs, spleen, left and right kidney, bladder, left and right hippocampus, left submandibular gland, and left and right thyroid gland, as well as significant (P<0.05) differences in the small intestine, right submandibular gland, and left adrenal gland. The coefficient of heart, lung, stomach, bladder, small and large intestine, brain, right hippocampus, and left adrenal gland showed highly significant differences (P<0.01), while differences in the right kidney, left hippocampus, left submandibular gland, right adrenal gland, and left and right thyroid gland were significant (P<0.05). With animal weight as the dependent variable and indicators of heart, lung, liver, spleen, left and right kidney and brain as independent variables for stepwise regression analysis, the regression equation showed that weight = 62.73 + left kidney

收稿日期：2012-12-12；接受日期：2013-01-30
基金项目：云南省教育厅科学研究基金 (2012C015)；云南省科技基础条件平台建设计划 (2006PT07-1)；国家科技支撑计划 (2009BAI83B02)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: jiaojianlin66@163.com
第一作者简介：李波 (1979−)，实验师，在读博士，E-mail:libo0302@sina.com.

× 79.21 + heart × 24.09. Female and male laboratory domesticated tree shrews showed certain influences in body size, organ weight and coefficient, and intestinal canal regarding anatomical parameters. This experiment provides basic data for studies on laboratory tree shrews and animal models.

Keywords: Tree shrew; Anatomical parameter; Weight of organ; Organ coefficient

解剖数据作为实验动物主要的生物学特性，是直接描述动物体征的主要数据群。灵长类近亲树鼩(tree shrew, *Tupaia belangeri*) 为单系起源的攀鼩目(Peng et al, 1991；Nie et al, 2008；Dong et al, 2012；Xu et al, 2013)，由于其特殊的生物学特性，已被广泛应用于医学和生物学研究，WHO 也曾建议用树鼩代替濒危的非人灵长类动物进行科学实验 (Peng et al, 1991)。近年来，树鼩实验室规模化驯养繁殖的成功 (Jiang et al, 2011；Jiao et al, 2009；Shen et al, 2011)加快了其实验动物化的进程。本研究对实验室驯养树鼩的解剖学数据进行了全面测定与分析，为树鼩实验动物化提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 动物来源

实验室驯养 7～9 月龄树鼩 70 只，雌、雄各半，由昆明医科大学实验动物学部提供。实验动物使用符合国家和学校动物伦理委员会规定并遵守国际惯例。

1.2 仪器、试剂及测定方法

解剖前，动物禁食不禁水 12 h，称重 (体重计购自上海精密科学仪器有限公司，YP2001N)后，腹腔注射戊巴比妥钠盐 35 mg/kg(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司，批号：20120812)，麻醉后心脏采血、处死。实验参照《啮齿类实验动物生物学特性数据测定技术规程》(He et al, 2006) 相关要求进行。获取体尺(软尺测量)及骨骼等解剖数据后依次采集腹腔、胸腔及脑等器官。采集脏器时需将周围脂肪及结缔组织除尽，滤纸吸干表面的血液和体液，腔性器官需在去除腔内液体和内容物后迅速称重 (梅特勒—托利多 AL204-IC 电子天平)。脏器系数=脏器重量 / 体重×100%。 剖取从胃幽门处至肛门处的所有肠段，置于盛有生理盐水的平皿中并在硫酸纸上展开，分别测量十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠及直肠等的长度。多个肠道需同时测量并由一人操作整个过程，避免由人为过度展开或展开不充分而造成测量数据不准确。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.5 软件包进行分析。正态计量资料采用 *t*-test，非正态用秩和检验。

2 结 果

2.1 解剖数据

树鼩有 7 个颈椎、13 个胸椎、6 个腰椎、3 个骶椎、24～27 个尾椎及 6 个乳头。雌、雄个体体长、尾长、尾/体比、胸宽、左后肢长以及盲肠和直肠长无显著性差异 (P>0.05)；体高、右耳宽、回肠及结肠长差异显著 (P<0.05)；体斜长、胸深、躯干长、左前肢长、右前肢长、右后肢长、左耳长、右耳长、左耳宽、龙骨长、左胫长、右胫长、十二指肠及空肠长等差异极显著 (P<0.01)(表 1，图 1)。

2.2 体尺指标的相关与回归分析

部分树鼩体尺数据的相关分析见表 2。以体长为因变量，部分体尺指标 (尾长、躯干长、左前肢长、右前肢长、左后肢长及右后肢长等)为自变量，作逐步回归分析，回归方程为：体长=13.90+尾长×0.16。

2.3 脏器及其系数测定

7~9 月龄树鼩雌、雄个体体重差异极显著 (P<0.01)；心、肺、膀胱及右海马重量及系数差异极显著 (P<0.01)；右肾、左海马、左颌下腺、左右甲状腺重量差异极显著(P<0.01)，系数差异显著(P<0.05)；小肠及左肾上腺重量差异显著(P<0.05)，系数差异极显著 (P<0.01)；脾及左肾重量差异极显著 (P<0.01)，但系数无差异；右颌下腺重量差异显著(P<0.05)，但系数无差异；胃、大肠及脑重量无差异，系数差异极显著 (P<0.01)；右肾上腺重量无差异，系数差异显著(P<0.05)。

2.4 主要脏器指标的相关与回归分析

树鼩主要脏器测定数据的相关分析见表 4。以体重为因变量，主要脏器指标(心、肺、肝、脾、左右肾及脑等)为自变量，作逐步回归分析，回归方程为：体重=62.73+左肾×79.21+心脏×24.09。

表 1 树鼩雌、雄个体解剖数据测量结果

Table 1 Measurement of anatomical parameters in tree shrew

测量项目 (cm) Item (cm)	雌 Female (♀) *n*=35					雄 Male (♂) *n*=35					*P*
	平均值	标准差	中位数	四分位数		平均值	标准差	中位数	四分位数		
	Mean	*SD*	Medium	D_L	D_U	Mean	*SD*	Medium	D_L	D_U	
体高 Body height	7.20	0.55	7.20	7.00	7.50	6.93	0.25	7.00	6.80	7.10	*
体长 Body length	16.68	0.48	16.50	16.50	17.00	16.59	0.43	16.60	16.40	16.80	
尾长 Tail length	16.73	0.71	17.00	16.50	17.00	16.85	0.64	17.00	16.50	17.30	
尾/体比 Tail/Body	1.00	0.05	1.01	0.97	1.03	1.02	0.04	1.02	0.98	1.04	
体斜长 Body slanting length	10.67	0.38	10.60	10.50	11.00	11.38	0.39	11.50	11.10	11.70	**
胸宽 Chest width	—	—	3.20	3.10	3.40	—	—	3.40	3.20	3.50	
胸深 Chest depth	4.88	0.37	5.00	4.70	5.00	—	—	5.40	5.20	5.50	**
躯干长 Torso length	—	—	9.00	9.00	10.00	10.18	0.55	10.30	9.90	10.50	**
左前肢长 Left forelimb length	—	—	9.00	8.70	9.20	9.47	0.33	9.40	9.20	9.80	**
右前肢长 Right forelimb length	—	—	9.00	8.80	9.20	9.31	0.36	9.30	9.10	9.50	**
左后肢长 Left hind limb length	11.07	0.32	11.00	11.00	11.30	11.20	0.51	11.30	11.10	11.40	
右后肢长 Right hind limb length	11.08	0.30	11.00	11.00	11.20	11.30	0.25	11.30	11.10	11.50	**
左耳长 Left ear length	1.56	0.23	1.60	1.50	1.70	—	—	1.20	1.10	1.20	**
右耳长 Right ear length	1.56	0.20	1.60	1.50	1.70	—	—	1.20	1.10	1.20	**
左耳宽 Left ear width	1.55	0.14	1.50	1.50	1.70	—	—	1.70	1.60	1.70	**
右耳宽 Right ear width	1.58	0.14	1.60	1.50	1.70	—	—	1.70	1.60	1.70	*
龙骨长 Keel bone length	1.04	0.13	1.10	0.90	1.10	—	—	1.20	1.10	1.20	**
左胫长 Left tibia length	3.55	0.23	3.50	3.40	3.70	—	—	3.20	3.10	3.30	**
右胫长 Right tibia length	3.54	0.26	3.50	3.30	3.80	—	—	3.20	3.10	3.30	**
十二指肠长 Duodenum length	10.66	2.37	11.00	9.50	12.00	12.33	2.67	12.00	10.00	14.00	**
空肠长 Jejunum length	47.76	5.13	48.00	44.00	50.00	39.70	7.08	40.00	32.00	46.00	**
回肠长 Ileum length	25.68	5.00	27.00	22.00	28.00	23.11	4.07	23.00	20.40	25.00	*
盲肠长 Cecum length	2.19	0.36	2.20	2.00	2.50	2.24	0.37	2.20	2.00	2.50	
结肠长 Colon length	5.99	1.14	6.00	5.00	7.00	5.42	0.78	5.20	5.00	6.00	*
直肠长 Rectum length	1.75	0.48	1.70	1.50	2.10	1.69	0.41	1.60	1.50	2.00	
左子宫体长 Left uterine body length	—	—	1.00	0.90	1.10	—	—	—	—	—	—
左子宫角长 Left uterine horns length	1.32	0.24	1.25	1.10	1.50	—	—	—	—	—	—
右子宫体长 Right uterine body length	1.07	0.26	1.00	0.90	1.10	—	—	—	—	—	—
右子宫角长 Right uterine horns length	1.29	0.26	1.20	1.10	1.50	—	—	—	—	—	—
阴道长 Vagina length	2.10	0.58	2.00	1.70	2.45	—	—	—	—	—	—
阴茎长 Penis length	—	—	—	—	—	3.57	0.33	3.50	3.30	3.80	

"—"：由于无对应值或数据非正态分布产生的统计缺省值。

"—": missing values because of no corresponding or data non-normal distribution. *：P<0.05；**：P<0.01.

3 讨 论

解剖数据是药物安全性评价实验及病原微生物感染的检测指标，可以客观反映实验动物生长发育程度、病变程度和功能状态等 (Sun et al, 2009)，对其种属标准化鉴定亦有一定意义 (Ye et al, 2011)。本研究丰富了中缅树鼩的解剖数据，为其实验动物化提供基础数据。结果显示 7~9 月龄树鼩的绝大部分体尺、脏器及系数指标因性别不同而存在显著或极显著性差异，与 Ye et al (2011)报道的野生成年树鼩结果基本一致。因此，若无特殊情况，在实验中应选择雌、雄个体各半，并分别对其

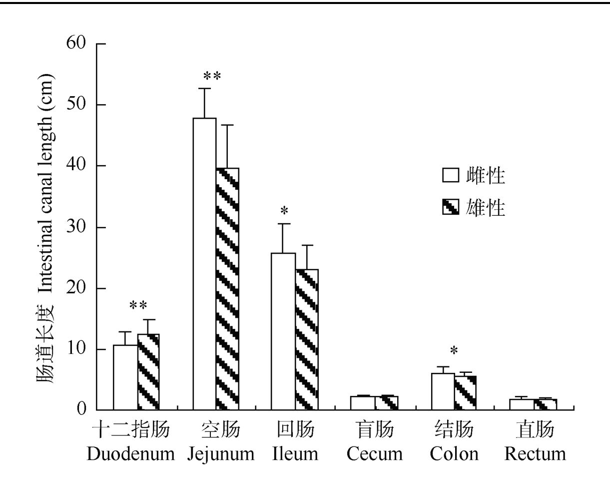


图 1　树鼩雌、雄个体肠道长度比较

Figure 1　Comparison of intestinal canal length (comparison between males and females, *: P<0.05; **:P<0.01)

进行统计分析和比较，研究结果与 Peng et al(1991)报道的解剖数据比较，绝大部分相近（如体长、尾长、耳长、脾脏重、肾脏重、脑重、肾上腺重、卵巢重及睾丸脏器系数等）。差异较大的是脑垂体重量，由于脑垂体体积较小，故该差异可能是由称量仪器与取材不同所导致。

小型哺乳动物的消化道长度和重量与其食性和食物质量密切相关 (Gross et al, 1985; Korn, 1992; Derting & Bogue, 1993)。小肠是食物消化和营养吸收的主要部位，在能量消耗增加或食物质量降低时，树鼩小肠长度及重量的增加可获得更多的能量以满足生存需要 (Cai et al, 2010)。本研究结果显示雌、雄个体的小肠各肠段均存在差异 (P<0.05)，雌性小肠重量显著高于雄性 (P<0.05)。因此，在实验室条件下，雌、雄个体对食物的消化和吸收能力是否存在差异仍有待进一步研究。

本研究结果显示雌、雄个体脑重量差异不显著(P>0.05)，系数差异显著 (P<0.05)，体重差异极显著 (P<0.01)，与 Ye et al (2011)的结果相反，这可能与个体发育阶段及生活环境相关。野生树鼩的确切年龄较难掌握，且其机体受季节及营养状况的影响较大 (Cao, 1989；Jiao et al, 2011; Li et al, 1994； Li et al , 2011)。实验动物随年龄的增长，其脑、心、肺、脾及肾等主要脏器系数都呈下降趋势 (Sun et al, 2009)。提示若能开展多年龄段或采用动态观测方法检测树鼩脏器重量及生长发育情况，将更有助于建立其基础生物学数据。

在脏器及其系数的测定分析中，与国内近年较少的研究结果相比 (He et al, 2008；Ye et al, 2011)，个体心脏、肝脏、肺脏、胰腺、脑及肠等均存在差异。其中，雌、雄个体心脏重量与系数差异极显著(P<0.01)，这与野生成年个体情况一致 (Ye et al, 2011)，但重量较轻，而肝脏重量小，胰腺重量大，且其重量与系数差异均不显著(P>0.05)。以上结果的差异可能由多方面原因导致：(1)研究对象、饲养环境及饲养条件等客观条件不同，本研究采用 7~9 月龄树鼩，与前期工作选用个体的年龄存在差异，且所选树鼩主要在实验室条件下以颗粒饲料喂养，与前期驯养及野外条件存在根本的不同；(2)个体的处死及测定方法不同，动物致死时，心脏及肝脏等器官内血液的充盈程度将直接影响其重量，因此，采集内脏器官应在采血后，且不同的采血部位也会影响脏器重量，本研究麻醉后心脏采血 5~8 mL 的致死方法可能也是导致差异的原因之一；(3)结缔组织及血管等分离情况不同；(4)研究对象不同的生长发育阶段导致能量代谢及积蓄不同；(5)样本量不同，Ye et al (2011)使用雄性 25 只，雌性 35 只，He et al (2008)使用雄性 12 只、雌性 15 只，而本研究使用雄、雌性各 35 只。

表 2　部分树鼩体尺指标的 Pearson 相关分析

Table 2　Pearson correlation of body size in tree shrew

项目/P 值 Item /P level	体长 Body length	尾长 Tail length	躯干长 Torso length	左前肢长 Left forelimb length	右前肢长 Right forelimb length	左后肢长 Left hind limb length	右后肢长 Right hind limb length
体长 Body length	1	0.242*	0.194	0.159	0.153	0.217	-0.002
尾长 Tail length	0.242*	1	−0.065	0.355**	0.344**	0.226	0.158
躯干长 Torso length	0.194	−0.065	1	0.201	0.181	0.247*	0.331**
左前肢长 Left forelimb length	0.159	0.355**	0.201	1	0.917**	0.173	0.269*
右前肢长 Right forelimb length	0.153	0.344**	0.181	0.917**	1	0.123	0.225
左后肢长 Left hind limb length	0.217	0.226	0.247*	0.173	0.123	1	0.480**
右后肢长 Right hind limb length	-0.002	0.158	0.331**	0.269*	0.225	0.480**	1

n = 70; *:P<0.05; **:P<0.01

表 3 树鼩雌、雄个体部分脏器测定结果 (mean±*SD*)

Table 3 Measurement of body and organ weight and coefficient in tree shrews

测定项目 Item	雌 Female(♀)*n*=35		雄 Male(♂)*n*=35		P_1	P_2
	脏器重量 (g) Organ weight (g)	脏器系数 (%) Organ coefficient (%)	脏器重量 (g) Organ weight (g)	脏器系数 (%) Organ coefficient (%)		
体重 Body weight	115.51±5.43	—	125.82±11.28	—	**	
心脏 Heart	0.62±0.09	0.54±0.07	0.85±0.12	0.68±0.08	**	**
肺脏 Lung	1.06±0.17	0.92±0.15	1.27±0.16	1.02±0.13	**	**
肝脏 Liver	3.86±0.53	3.35±0.52	4.09±0.51	3.25±0.31		
脾脏 Spleen	(0.13)	(0.11)	0.15±0.03	0.12±0.02	**	
左肾 Left kidney	0.48±0.05	0.41±0.04	0.54±0.06	0.43±0.04	**	
右肾 Right kidney	0.47±0.05	0.40±0.04	0.53±0.07	0.42±0.04	**	*
胃 Stomach	0.91±0.09	0.79±0.09	0.90±0.10	0.72±0.10		**
膀胱 Bladder	0.08±0.02	(0.07)	0.13±0.03	0.10±0.02	**	**
小肠 Small intestine	4.20±0.73	3.65±0.66	3.83±0.74	3.08±0.66	*	**
大肠 Large intestine	2.02±0.45	1.75±0.06	1.86±0.4	1.49±0.33		**
脑 Brain	2.97±0.18	2.58±0.19	3.05±0.19	2.44±0.21		**
小脑 Cerebellum	0.50±0.07	0.44±0.07	0.52±0.09	0.41±0.08		
左海马 Hippocampus	0.09±0.04	0.08±0.03	0.12±0.02	0.09±0.02	**	*
右海马 Hippocampus	0.08±0.02	0.07±0.02	0.12±0.03	0.09±0.03	**	**
脑垂体 Pituitary	(0.0038)	(0.0033)	0.0046±0.0027	0.0037±0.0023		
左颌下腺 Left submaxillary gland	0.18±0.03	0.15±0.03	(0.21)	(0.17)	**	*
右颌下腺 Right submaxillary gland	0.17±0.03	0.15±0.02	0.20±0.05	0.16±0.04	*	
左腮腺 Left parotid	0.16±0.03	0.14±0.03	0.17±0.04	0.13±0.04		
右腮腺 Right parotid	0.16±0.03	0.14±0.03	0.16±0.04	0.13±0.04		
胸腺 Thymus	0.05±0.03	0.05±0.02	0.06±0.02	0.05±0.02		
胰腺 Pancreas	0.52±0.11	0.45±0.09	0.52±0.13	0.41±0.1		
左肾上腺 Left adrenal	0.0228±0.0059	0.0198±0.0052	0.0196±0.005	0.0157±0.0038	*	**
右肾上腺 Right adrenal	(0.0225)	(0.0196)	0.0211±0.0047	0.0168±0.0035		*
左甲状腺 Left thyroid	0.0056±0.0038	0.0049±0.0034	0.0089±0.0053	0.0071±0.0044	**	*
右甲状腺 Right thyroid	0.0055±0.0038	0.0048±0.0033	0.009±0.0057	0.0072±0.0046	**	*
左卵巢 Left ovary	0.0048±0.0024	0.0041±0.0021	—	—		
右卵巢 Right ovary	0.0047±0.0024	0.0041±0.0021	—	—		
子宫 Uterus	0.2±0.08	0.17±0.06	—	—		
左尿道球腺 Left bulbourethral gland	—	—	(0.0282)	(0.0215)		
右尿道球腺 Right bulbourethral gland	—	—	(0.0308)	(0.0248)		
阴茎 Penis	—	—	0.29±0.1	0.23±0.07		
左睾丸 Left testis	—	—	0.47±0.1	0.37±0.07		
右睾丸 Right testis	—	—	0.46±0.09	0.36±0.06		
左精囊腺 Left seminal vesicle	—	—	(0.09)	(0.07)		
右精囊腺 Right seminal vesicle	—	—	0.09±0.03	0.07±0.02		
前列腺 Prostate	—	—	0.07±0.02	0.05±0.02		

P_1 :脏器重量比较, *:P_1<0.05, **:P_1<0.01。P_2 :脏器系数比较, *:P_2<0.05, **:P_2<0.01； "—"由于无对应值产生的缺省；由于数据非正态分布用"(中位数)"描述数据的集中趋势。

P_1: Comparison of organ weight，*:P_1<0.05, **:P_1<0.01; P_2: Comparison of organ coefficient，*:P_2<0.05, **:P_2<0.01; Hyphens in the table are missing values because of no corresponding date; Describe the central tendency of the data using Median because data showed non-normal distribution.

表 4　树鼩主要脏器指标的 Pearson 相关分析

Table 4　Pearson correlation of major organs in tree shrew

指标/*P* 值 Index/P level	体重 Weight	心脏 Heart	肺脏 Lung	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	左肾 Lift Kidney	右肾 Right Kidney	脑 Brain
体重 Body weight	1	0.635**	0.464**	0.420**	0.074	0.701**	0.689**	0.360**
心脏 Heart	0.635**	1	0.490**	0.271*	0.037	0.529**	0.518**	0.302*
肺脏 Lung	0.464**	0.490**	1	0.356**	0.024	0.369**	0.414**	0.158
肝脏 Liver	0.420**	0.271*	0.356**	1	0.075	0.530**	0.499**	-0.036
脾脏 Spleen	0.074	0.037	0.024	0.075	1	−0.038	0.018	0.132
左肾 Lift Kidney	0.701**	0.529**	0.369**	0.530**	−0.038	1	0.903**	0.296*
右肾 Right Kidney	0.689**	0.518**	0.414**	0.499**	0.018	0.903**	1	0.292*
脑 Brain	0.360**	0.302*	0.158	−0.036	0.132	0.296*	0.292*	1

$n = 70$; *:$P<0.05$, **:$P<0.01$.

近年来，树鼩作为人类疾病动物模型有了新的发展。由于种系、性别、年龄、体重及饲养条件等因素影响，进一步完善实验室驯养树鼩的生物学数据 (体尺、脏器重量、血液生理及血液生化等基础指标)，对其实验动物化研究及应用具有重要意义。

参考文献：

Cao XM. 1989. The seasonal variation of spermatogenesis in *Tupaia belangeri chinensis*. *Zoological Research,* **10**(1): 16-21. [曹筱梅. 1989. 树鼩(*Tupaia belangeri chinensis*)精子发生的季节性变化. 动物学研究, **10**(1): 16-21.]

Cai JH, Zhu WL, Xie J, Jia T, Wang R, Lian X, Wang ZK. 2010. Variations on length and weight of the digestive tract in *Tupaia belangeri*. *Chinese Journal of Zoology,* **45**(1): 140-144. [蔡金红, 朱万龙, 谢静, 贾婷, 王睿, 练硝, 王政昆. 2010. 中缅树鼩消化道长度和重量变化. 动物学杂志, **45**(1): 140-144.]

Derting TL, Bogue BA. 1993. Responses of the gut to moderate energy demands in a small herbivore (*Microtus pennsylvanicus*). *Journal of Mammalogy,* **74**(1): 59-68.

Dong L, Lü BL, Lai R. 2012. Molecular cloning of *Tupaia belangeri chinensis* neuropeptide Y and homology comparison with other analogues from primates. *Zoological Research,* **33**(1): 75-78. [董丽, 吕龙, 赖仞. 2012. 树鼩神经肽 Y 的分子克隆及其灵长类类似物的同源性比较. 动物学研究, **33**(1): 75-78.]

Gross JE, Wang Z, Wunder B. 1985. Effects of food quality and energy needs: Changes in gut morphology and capacity of *Microtus ochrogaster*. *Journal of Mammalogy,* **66**(6): 661-667.

He BL, Liu RW, Chen LL, Zheng H, Li B. 2008. The measurement of weight of main organs and the correlation research of organ weight & body weight in Tree Shrew. *Laboratory Animal Science,* **25**(5): 17-19. [何保丽, 刘汝文, 陈丽玲, 郑红, 李波. 2008. 树鼩脏器系数的测定及脏器重量与体重相关性的探讨. 实验动物科学, **25**(5): 17-19.]

He ZM. 2006. Determination of Biological Characteristics of Laboratory Rodents Data Technical Regulations. Beijing: China Standards Press, 53-54. [贺争鸣. 2006. 啮齿类实验动物生物学特性数据测定技术规程. 北京: 中国标准出版社, 53-54.]

Jiao JL, Li B, Li JT, Zeng H, Chen LL, Shen PQ, Zheng H. 2011. Comparative analysis of nutritional status in wild and laboratory domesticated tree shrews. *Laboratory Animal and Comparative Medicine,* **31**(4): 290-292. [角建林, 李波, 李进涛, 曾河, 陈丽玲, 沈培清, 郑红. 2011. 野生和实验室树鼩营养状况的对比分析. 实验动物与比较医学, **31**(4): 290-292.]

Jiao JL, Liu RW, Chen LL, Li B, He BL, Zheng H, Shen PQ. 2009. The development and use of tree shrew resource and its standards research-the strategic discussion for laboratory animal resource development in China. *Chinese Journal of Comparative Medicine,* **19**(7): 73-78. [角建林, 刘汝文, 陈丽玲, 李波, 何保丽, 郑红, 沈培清. 2009. 树鼩资源的开发利用与标准化研究-我国实验动物资源建设发展战略探讨. 中国比较医学杂志, **19**(7): 73-78.]

Jiang QF, Kuang DX, Tong PF, Sun XM, Dai JJ. 2011. Scale breeding of tree shrews and the establishment of breeding population. *Laboratory Animal Science,* **28**(6): 35-38. [江勤芳, 匡德宣, 仝品芬, 孙晓梅, 代解杰. 2011. 树鼩规模化繁殖及繁殖群的建立. 实验动物科学, **28**(6): 35-38.]

Korn H. 1992. Intestine lengths of southern African savanna rodents and insectivores: Intra-and inter-specific comparisons. *Journal of Zoology,* **228**(5): 455-460.

Li XT, Zhu WL, Liu X, Liu CY, Wang ZK. 2011. Seasonal changes of energy metabolism in *Tupaia belangeri*. *Acta Theriologica Sinica,* **31**(3): 291-298. [李晓婷, 朱万龙, 刘鑫, 刘春燕, 王政昆. 2011. 中缅树鼩能量代谢的季节变化. 兽类学报, **31**(3): 291-298.]

Li YC, Hu JS, Li CM, Wang MK, Zhang SQ, Ouyang M, He Y, Xu GS. 1994. The annual periodic variations of reproductive system in *Tupaia belangeri chinensis*. *Journal of Yunnan University: Natural Sciences,* **16**(1): 75-80. [李永材, 胡健生, 李春茂, 王敏康, 张士强, 欧阳明, 何云, 徐国枢. 1994. 成年树鼩生殖系统的年周期变化. 云南大学学报: 自然科学版, **16**(1): 75-80.]

Nie W, Fu B, O'Brien PC, Wang J, Su W, Tanomtong A, Volobouev V, Ferguson-Smith MA, Yang F. 2008. Flying lemurs: the 'flying tree shrews'? Molecular cytogenetic evidence for a Scandentia-Dermoptera sister clade. *BMC Biology*, 6: 18.

Peng YZ, Ye ZZ, Zou RJ, Wang YX, Tian BP, Ma YY, Shi LM. 1991. Biology of Chinese Tree Shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). Kunming: Yunnan Science and Technology Press. [彭燕章, 叶智章, 邹如金, 王应祥, 田保平, 马原野, 施立明. 1991. 树鼩生物学. 昆明: 云南科技出版社.]

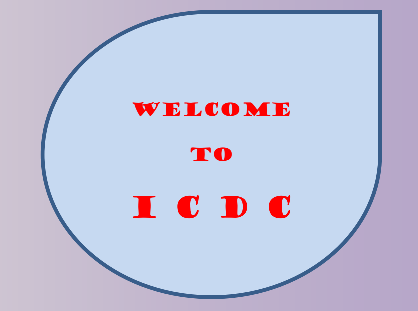
Sun JX, An J, Lian J. 2009. Analysis of effect factors of the weight and coefficients in laboratory Animal. *Laboratory Animal Science,* **26**(1): 49-51. [孙建新, 安娟, 连军. 2009. 影响实验动物脏器重量及脏器系数因素分析. 实验动物科学, **26**(1): 49-51.]

Shen PQ, Zheng H, Liu RW, Chen LL, Li B, He BL, Li JT, Ben KL, Cao XM, Jiao JL. 2011. Progress and prospect in research on laboratory tree shrew in China. *Zoological Research,* **32**(1): 109-114. [沈培清, 郑红, 刘汝文, 陈丽玲, 李波, 何保丽, 李进涛, 贲昆龙, 曹筱梅, 角建林. 2011. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望. 动物学研究, **32**(1): 109-114.]

Xu L, Fan Y, Jiang XL, Yao YG. 2013. Molecular evidence on the phylogenetic position of tree shrew (*Tupaia belangeri*). *Zoological Research,* **34**(2): 70-76. [许凌, 范宇, 蒋学龙, 姚永刚. 2013. 树鼩进化分类地位的分子证据. 动物学研究, **34**(2): 70-76.]

Ye YS, Han YY, Huan ZQ, Lu CX, Jiang QF, Sun XM, Dai JJ. 2011. Measurement and analysis of the weight and coefficients of major organs in wild adult tree shrews. *Chinese Journal of Comparative Medicine,* **21**(4): 62-65. [叶尤松, 罕园园, 黄璋琼, 陆彩霞, 江勤芳, 孙晓梅, 代解杰. 2011. 野生成年树鼩主要脏器重量及脏器系数的测定分析. 中国比较医学杂志, **21**(4): 62-65.]

如果你热爱生命科学！
如果你立志投入科学研究！
如果你想学习国际顶尖的科研技术！



欢迎报考本中心研究生并参加暑期培训！

昆明动物研究所离子通道药物研发中心

暑期培训通知



中国科学院昆明动物研究所“离子通道药物研发中心”将举办暑期培训班（每年暑假），旨在提高学生掌握专业理论知识、实验技术、实验设计以及数据分析的能力。我们有完善的系统的培训体制，并一直在不断努力为学生打造最佳的学习环境。欢迎二、三年级本科生踊跃报名参加！暑期培训申请即日开始。

“离子通道药物研发中心”是由美国哥伦比亚大学、华盛顿大学等多所海外著名大学教授为学术核心，国内青年科学家为骨干组成的联合研究机构，与中国科学院和云南省“动物模型与人类疾病机理重点实验室”密切合作。本中心的研究领域和方向是研究新型、具有重要功能、与重大疾病相关的离子通道和转运体的结构、功能与调节，发现以离子通道和转运体为靶点的、具有应用和药物开发前景的天然及合成分子。

有兴趣并打算报考本中心的二、三年级本科生可提前与我们联系，同时请提交一份简历。我们将从中选取优秀的学生在暑期到本中心进行学习和交流。我们非常欢迎有诚信、有责任感、热爱科学研究、生物学理论知识扎实的同学加入我们的科研队伍。本中心有着富于创新、乐观向上的文化，并鼓励和培养富于探索和创造、勇于挑战现有范式的开拓精神。你们将加入的是一个全新的拥有国际先进学术水平、顶尖科研技术和现代化管理的研究团队，本中心的研究生将有机会得到海外团队成员的直接指导，学到最新的最先进的理论知识和技术方法，以及到国际一流大学培训深造。

本中心计划每年招收 2 名硕士生，2 名博士生。我们会为前来实习的本科生提供住处和基本的生活补贴，正式录取的研究生也将享受优良的生活待遇。

联系邮箱：icdc@mail.kiz.ac.cn

更多了解请访问本中心主页：http://159.226.149.45/icdc/default.asp